

ANALYSE DER IDENTITÄT UND ABUNDANZ METHANOGENER ARCHAEEN IN BIOGASANLAGEN

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften

der Technischen Universität Dresden

von

M. Sc. Juliane Theiss

geboren am 18.12.1988 in Leisnig

Gutachter: Prof. Dr. Michael Rother (Technische Universität Dresden)
Prof. Dr. habil. Isolde Röske (Technische Universität Dresden)

Verteidigt am: 16.12.2016

„Man muss viel gelernt haben, um über das, was man nicht weiß, fragen zu können“

Jean-Jacques Rousseau (1712-1778)

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Arbeit wurde an der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig unter der fachlichen Betreuung von Herrn Prof. Michael Rother (Technische Universität Dresden) und Frau Dr. Kerstin Röske (Sächsische Akademie der Wissenschaften zu Leipzig) angefertigt.

Die Promotionsordnung in der Fassung vom 23.02.2011 wird anerkannt.

Dresden, den 07.09.2016

I INHALTSVERZEICHNIS

Erklärung	I
I Inhaltsverzeichnis.....	II
II Veröffentlichungen	VI
III Abkürzungsverzeichnis	VIII
IV Abbildungsverzeichnis.....	XII
V Tabellenverzeichnis.....	XVI
1 Einleitung.....	1
1.1 Anaerobe Fermentation.....	1
1.1.1 Hydrolyse und Acidogenese (primäre Fermentation).....	2
1.1.2 Acetogenese (sekundäre Fermentation).....	2
1.1.3 Methanogenese	3
1.2 Technische Anwendung der Methanogenese- der Biogasprozess	4
1.2.1 Allgemeine Aspekte der Biogasgewinnung	4
1.2.2 Prozessparameter	6
1.2.2.1 Anlagenbetrieb	6
1.2.2.2 Substrate	7
1.2.2.3 Prozessstörung.....	9
1.3 Methanogene Archaea.....	11
1.4 Molekularbiologische Analyseverfahren zur Charakterisierung komplexer mikrobieller Biozönosen	13
1.4.1 Auf isolierter DNA basierende Methodik	14
1.4.2 In situ Analysen.....	15
1.5 Zielstellung der Arbeit.....	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Untersuchte Proben.....	19
2.1.1 Proben aus Reaktoren im Normalbetrieb	19
2.1.2 Kontinuierliche Hemmversuche im 9 l Maßstab.....	21
2.1.2.1 Allgemeine Durchführung	21

2.1.2.2	Ammonium-Toxizitäts-Versuche.....	21
2.1.2.3	Versauerungsversuche	22
2.2	Bestimmung chemischer Parameter.....	23
2.3	DNA-basierte Analytik.....	24
2.3.1	Isolation von gesamt DNA und Konzentrationsbestimmung.....	24
2.3.2	Polymerase- Kettenreaktion (PCR).....	25
2.3.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	28
2.3.4	Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE).....	29
2.3.5	Analyse ausgewählter DGGE-Signale	31
2.3.6	Klonierung und Sequenzanalyse	32
2.3.7	Quantitative PCR (qPCR).....	33
2.3.8	454-Amplikonsequenzierung.....	36
2.4	In situ Analytik	39
2.4.1	Gesamtzellzahlbestimmung.....	39
2.4.2	Catalyzed reporter deposition Fluoreszenz in situ Hybridisierung (CARD-FISH) ...	39
2.4.2.1	Klassische CARD-FISH	39
2.4.2.2	Optimierung der CARD-FISH.....	43
2.4.2.3	Modifizierte CARD-FISH für Proben aus Biogasschlamm	45
2.5	Statistische Analysen	45
3	Ergebnisse.....	47
3.1	Etablierung geeigneter Analyse-Methoden zur Untersuchung von Proben aus Biogasanlagen.....	47
3.1.1	DNA-Isolation.....	47
3.1.1.1	Evaluation verschiedener Kit-Systeme.....	47
3.1.1.2	Optimierung der eingesetzten Probenmenge	55
3.1.2	Optimierung der DGGE.....	56
3.1.3	CARD-FISH.....	60
3.2	Archaeelle Diversität in verschiedenen Biogasanlagen	65
3.2.1	Archaeelle Biozönose der Anlage A.....	65

3.2.1.1	Normalbetrieb der Anlage.....	65
3.2.1.2	Simulation von Prozessstörungen.....	78
3.2.2	Archaeelle Biozönose der Anlagen B und C.....	89
3.2.3	Archaeelle Biozönose der Anlagen KA und KL	99
3.3	Bakterielle Diversität in verschiedenen Biogasanlagen	108
3.3.1	Bakterielle Biozönose während des Normalbetriebes	108
3.3.2	Bakterielle Biozönose bei Prozessstörungen	111
4	Diskussion.....	116
4.1	Evaluierung molekularer Methoden zur Untersuchung von Mikroorganismen in Biogasanlagen.....	116
4.2	Archaeelle Biozönose in Biogasanlagen in Abhängigkeit vom eingesetzten Substrat.	121
4.3	Bakterielle Biozönose in Biogasanlagen in Abhängigkeit vom eingesetzten Substrat.	136
4.4	Veränderungen der mikrobiellen Population durch Prozessstörungen	140
5	Zusammenfassung	148
6	Literaturverzeichnis.....	150
VI	Anhang	173
	Danksagung	VI

II VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits im Rahmen der folgenden Publikationen und Konferenzbeiträgen veröffentlicht:

Theiss J., Rother M., Röske K. Influence of DNA isolation method on the investigation of archaeal diversity and abundance in biogas plants. *Arch Microbiol.* 198 (7), 2016, 619-628

Kern T.*, Theiss J.*, Röske K., Rother M. Assessment of hydrogen metabolism in commercial anaerobic digesters. *Appl Microbiol Biotechnol.* 100 (10), 2016, S. 4699-4710.

*Beide Autoren haben gleichwertig zur Arbeit beigetragen.

Kern T., Theiss J., Rother M. Establishing new parameters for monitoring of anaerobic digestion. *VAAM-Tagung*, 2015.

Theiss J., Rother M., Röske K. Archaeal diversity during anaerobic digestion of maize silage and municipal wastewater. *DGHM/VAAM-Tagung*, 2014.

III ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
ACE	„Abundance-based Coverage Estimator“
ad.	auffüllen auf
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AUT	Österreich
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BEL	Belgien
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
CARD	„Catalyzed reporter deposition“
CoB-SH	Co-Faktor B (N-7-Mercaptoheptanoyl-O-Phospho-L-Threonin)
CoM-SH	Co-Faktor M (2-Mercaptoethansulfonat)
CoM-S-S-CoB	Disulfid aus CoM und CoB
CXR	Referenzfarbstoff für qPCR
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DEU	Deutschland
DEPC	Diethyldicarbonat
D-Fe	gelöstes Eisen (beinhaltet sowohl Fe-(II)- als auch Fe-(III)-Ionen)
DGGE	Denaturierende Gradientengelelektrophorese
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („Deoxyribonucleic acid“)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd
FAM	6-Carboxyfluorescein
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FM	Frischmasse
FOS	flüchtige organische Säuren

Abkürzung	Bedeutung
GZZ	Gesamtzellzahl
HRP	Meerrettichperoxidase („ <i>horseradish peroxidase</i> “)
HRT	hydraulische Verweilszeit („ <i>hydraulic retention time</i> “)
IPBA	<i>p</i> -Jodophenylborsäure
Jet	GeneJET Genomic DNA Purification Kit
LB _{amp}	LB („ <i>lysogeny broth</i> “) Nährmedium versetzt mit Ampicillin
MetOH	Methanol
MN	Nucleo Spin Soil Kit
NLD	Niederlande
NawaRo	Nachwachsende Rohstoffe
NCBI	„ <i>National Center for Biotechnology Information</i> “
NGS	„ <i>Next Generation Sequencing</i> “
NH ₄ ⁺ -N	Ammonium-Stickstoff
OLR	Raumbelastung („ <i>organic loading rate</i> “)
oTS	organische Trockensubstanz
OTU	„ <i>Operational Taxonomic Unit</i> “
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („ <i>phosphate buffered saline</i> “)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („ <i>polymerase chain reaction</i> “)
PFA	Paraformaldehyd
PS	Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit
p. Z.	pro Zyklus
Qia	QIAamp DNA Stool Mini Kit
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
ρ	Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient
RDP	„ <i>Ribosomal Database Project</i> “
rpm	Umdrehungen pro Minute („ <i>rounds per minute</i> “)
RT	Raumtemperatur
SAO	Syntrophe Acetat Oxidation
SBR	„ <i>sequential batch reactor</i> “
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SO ₄ -S	Sulfat-Schwefel
TAC	gesamter anorganischer Kohlenstoff („ <i>total anorganic carbon</i> “)
TAMRA	Tetramethylrhodamine

Abkürzung	Bedeutung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
UASB	<i>„up-flow anaerobic sludge blanket“</i>
UC	Ultra Clean® Soil DNA Isolation Kit
UK	<i>„United Kingdom“</i>
ü. N.	über Nacht
UPGMA	<i>„Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean“</i>
USA	<i>„United States of America“</i>
V	Hypervariable Region der 16S rDNA

IV ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Ablaufs der anaeroben Fermentation.	1
Abbildung 2: Zusammensetzung der deutschlandweiten Brutto-Stromerzeugung im Jahr 2014.	5
Abbildung 3: Massebezogener Substrat-einsatz deutscher Biogasanlagen im Jahr 2014.	7
Abbildung 4: Gasausbeuten verschiedener Substrate.	8
Abbildung 5: Gelelektrophoretische Darstellung der mit verschiedenen Kit-Systemen isolierten DNA aus Biogasschlamm.	49
Abbildung 6: Archaeelle DGGE-Profile (<i>Primer</i> : Parch519f und A915r_GC) nach DNA-Isolation mit verschiedenen Kit-Systemen.	50
Abbildung 7: Archaeelle DGGE-Profile (<i>Primer</i> : Parch340f und A915r_GC) nach DNA-Isolation mit verschiedenen Kit-Systemen.	51
Abbildung 8: Spezifische <i>Methanobacteriales</i> -DGGE nach DNA-Isolation mit verschiedenen Kit-Systemen.	53
Abbildung 9: Mittels qPCR ermittelte Zellzahlen nach DNA-Isolation mit verschiedenen Kit-Systemen.	54
Abbildung 10: Isolierte DNA bei Verwendung von 0,2 und 0,05 g Probenmaterial.	55
Abbildung 11: Test verschiedener <i>Primer</i> -Systeme zur Etablierung einer spezifischen Archaea-DGGE.	58
Abbildung 12: Berechnete potentielle Sekundärstrukturen des DGGE-Fragmentes eines Klon aus Anlage A.	59
Abbildung 13: Einfluss der enzymatischen Vorbehandlung auf die CARD-FISH.	64
Abbildung 14: Mittels DGGE visualisierte archaeelle Dynamik in Anlage A.	65
Abbildung 15: Visualisierung der <i>Methanobacteriales</i> in Anlage A mittels DGGE.	68
Abbildung 16: Abundanzen der Bacteria, Archaea sowie der Genera <i>Methanoculleus</i> und <i>Methanosarcina</i> in Anlage A.	71
Abbildung 17: Konzentrationen der flüchtigen organische Säuren, des Ammonium-Stickstoffes und des Sulfat-Schwefels sowie die oTS in Anlage A.	73
Abbildung 18: Mittels CARD-FISH bestimmte relative Abundanzen der Bacteria, Archaea und <i>Methanosarcinales</i> in Anlage A.	74
Abbildung 19: Mittels CARD-FISH visualisierte Methanosarcinen.	75
Abbildung 20: Fütterungsprofil der Anlage A.	76
Abbildung 21: Konzentration des gelösten Eisens in Anlage A.	76
Abbildung 22: Aus der Archaea-spezifischen 454-Amplikonsequenzierung resultierende <i>rarefaction</i> -Kurve der Anlage A.	77
Abbildung 23: Durch Archaea-spezifische 454-Amplikonsequenzierung bestimmte relative Abundanzen der einzelnen Genera in Anlage A.	78
Abbildung 24: Mittels DGGE visualisierte archaeelle Diversität im Verlauf von Prozessstörungen.	79
Abbildung 25: Dynamik der spezifischen <i>Methanobacteriales</i> -DGGE-Profile während Prozessstörungen.	83
Abbildung 26: Abundanzen der Bacteria, Archaea sowie der Genera <i>Methanoculleus</i> und <i>Methanosarcina</i> während der Prozessstörungen.	84
Abbildung 27: Mittels CARD-FISH bestimmte relative Abundanzen der Bacteria, Archaea und <i>Methanosarcina</i> bei Prozessstörungen.	85

Abbildung 28: Aus der Archaea-spezifischen 454-Amplikonsequenzierung resultierende <i>rarefaction</i> -Kurven verschiedener Hemmpuben.....	86
Abbildung 29: Durch Archaea-spezifische 454-Amplikonsequenzierung bestimmte Dynamik der einzelnen Genera im Verlauf von Prozessstörungen.....	88
Abbildung 30: Chemische Charakterisierung der Anlagen B und C.	89
Abbildung 31: Archaeelle DGGE-Profile der Proben aus den Anlagen B und C im Vergleich zu Anlage A.	90
Abbildung 32: Mittels DGGE visualisierte Biozönose der <i>Methanobacteriales</i> in den Anlagen B und C im Vergleich zu Anlage A.....	92
Abbildung 33: Zellzahlen der Bacteria, Archaea sowie der methanogenen Genera <i>Methanoculleus</i> und <i>Methanosarcina</i> in Anlage B.....	96
Abbildung 34: Relative Abundanzen der Bacteria, Archaea und <i>Methanosarcinales</i> in den Anlagen B und C.	96
Abbildung 35: Aus der Archaea-spezifischen 454-Amplikonsequenzierung resultierende <i>rarefaction</i> -Kurven der Anlagen B und C.....	97
Abbildung 36: Durch Archaea-spezifische 16S-Amplikonsequenzierung bestimmte relative Abundanzen der einzelnen Genera in den Anlagen B und C.....	98
Abbildung 37: Archaeelle DGGE-Profile der Anlagen KA und KL im Vergleich zu Anlage A.	100
Abbildung 38: <i>Methanobacteriales</i> spezifische DGGE-Profile der Anlagen KA und KL.....	102
Abbildung 39: Mittels qPCR ermittelte Abundanzen der Bacteria, Archaea sowie der Genera <i>Methanoculleus</i> und <i>Methanosarcina</i> in den Anlagen KA und KL.....	105
Abbildung 40: Mittels CARD-FISH bestimmte relative Abundanzen der Bacteria, Archaea und <i>Methanosarcinales</i> in den Anlagen KA und KL.	105
Abbildung 41: Aus der Archaea-spezifischen 454-Amplikonsequenzierung resultierende <i>rarefaction</i> -Kurven der Anlagen KA und KL.	106
Abbildung 42: Durch Archaea-spezifische 16S-Amplikonsequenzierung bestimmte relative Abundanzen der einzelnen Genera in den Anlagen KA und KL.	107
Abbildung 43: Aus der Bacteria-spezifischen 454-Amplikonsequenzierung resultierende <i>rarefaction</i> -Kurven der verschiedenen Anlagen.	109
Abbildung 44: Durch Bacteria-spezifische 454-Amplikonsequenzierung bestimmte relative Abundanzen der einzelnen Taxa in den Anlagen.....	110
Abbildung 45: Aus der Bacteria-spezifischen 454-Amplikonsequenzierung resultierende <i>rarefaction</i> -Kurven der einzelnen Hemmpuben.....	112
Abbildung 46: Durch Bacteria-spezifische 16S-Amplikonsequenzierung bestimmte relative Abundanzen der einzelnen Taxa im Verlauf von Prozessstörungen.....	113
Abbildung 47: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf der Archaea-Klonierung.	126
Abbildung 48: Dendrogramme auf Basis der Archaea-spezifischen DGGE-Profile (A) bzw. der 454-Amplikonsequenzierung (B).	127
Abbildung 49: Dendrogramm auf Basis der <i>Methanobacteriales</i> - spezifischen DGGE-Profile.	129
Abbildung 50: Phylogenetischer Stamm-baum basierend auf der <i>Methano-bacteriales</i> -Klonierung.	130
Abbildung 51: Dendrogramm auf Basis der Archaea (A)- und <i>Methanobacteriales</i> -(B)- spezifischen DGGE-Profile.....	147

Abbildung A1: Cluster-Analyse der DGGE-Replikate bei Verwendung des <i>Primer</i> -Paares Parch519f und A915r_GC.	173
Abbildung A2: Cluster-Analyse der DGGE-Replikate bei Verwendung des <i>Primer</i> -Paares Parch340f und A915r_GC.	174

V TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Physiologische Eigenschaften der einzelnen Ordnungen methanogener Archaea.....	12
Tabelle 2: Anlagendaten der beprobten Biogasanlagen.....	19
Tabelle 3: Fütterungsprofile, Raumbelastung und hydraulische Verweilzeit der einzelnen untersuchten Proben.	20
Tabelle 4: Probenübersicht der Ammonium-Toxizitäts-Versuche.....	22
Tabelle 5: Probenübersicht der Versauerungsversuche.	23
Tabelle 6: Zur Bestimmung der chemischen Parameter verwendete Methoden.	24
Tabelle 7: Getestete kommerzielle DNA-Isolations-Kits.	25
Tabelle 8: Verwendete <i>Primer</i> , deren 5'-3'-Sequenz, Spezifität und Verwendung.....	26
Tabelle 9: Komponenten eines PCR-Ansatzes mit der goTaq® DNA Polymerase.....	27
Tabelle 10: Komponenten eines PCR-Ansatzes mit der Perpetual <i>Taq</i> DNA Polymerase.	27
Tabelle 11: Verwendete PCR-Programme.....	27
Tabelle 12: Zusammensetzung des 50x TAE-Puffers.	29
Tabelle 13: Zusammensetzung der Stammlösungen für DGGE-Gele.	30
Tabelle 14: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele.	30
Tabelle 15: Reaktionsbedingungen einer Sequenzier-PCR.	32
Tabelle 16: Für die qPCR verwendete <i>Primer</i> , deren Sequenz und Spezifität.....	33
Tabelle 17: Zusammensetzung einer qPCR-Reaktion unter Verwendung der goTaq DNA Polymerase.	34
Tabelle 18: Komponenten einer qPCR mit dem GoTaq qPCR Master Mix.....	34
Tabelle 19: Reaktionskomponenten einer <i>Archaea</i> -spezifischen qPCR.	34
Tabelle 20: Verwendete qPCR-Thermocycler mit zugehöriger Software und den verwendeten Reaktionsgefäßen.	35
Tabelle 21: Verwendete qPCR-Programme.....	35
Tabelle 22: Für die 454-Amplikonsequenzierung verwendete <i>Primer</i> , deren 5'-3'-Sequenz und Spezifität.....	37
Tabelle 23: PCR-Programme für die 454-Amplikonsequenzierung.	38
Tabelle 24: Zusammensetzung einer PBS-Lösung.	39
Tabelle 25: Für die CARD-FISH verwendete Oligonukleotidsonden, deren 5'-3'-Sequenz, Spezifität und die im Hybridisierungspuffer enthaltene Formamidkonzentration.	41
Tabelle 26: Für die CARD-FISH verwendete Lösungen.....	41
Tabelle 27: DNA-Konzentrationen und zugehörige 260/280 Quotienten.	48
Tabelle 28: DNA-Konzentrationen, zugehörige 260/280-Quotienten und Ct-Werte in Abhängigkeit verschiedener zur DNA-Isolation eingesetzter Probenmengen.	55
Tabelle 29: Für die DGGE getestete <i>Primer</i> -Kombinationen, deren amplifizierte Hypervariable Region und das PCR-Resultat.	57
Tabelle 30: Getestete Modifikationen zur Optimierung der CARD-FISH für Proben aus Biogasanlagen.	61
Tabelle 31: Taxonomische Zuordnung der Archaea-DGGE-Signale aus Anlage A.	66
Tabelle 32: Taxonomische Einordnung <i>Methanobacteriales</i> -spezifischer DGGE Signale und zusätzlicher Klone.	69

Tabelle 33: Durch Archaea-spezifische 454-Amplikonsequenzierung erfasste Anzahl der Sequenzen und OTUs sowie Diversitätsindices der Anlage A.	77
Tabelle 34: Taxonomische Zuordnung spezifischer DGGE-Signale nach Ammonium-Intoxikation durch Reamplifikation.....	80
Tabelle 35: Durch Archaea-spezifische 454-Amplikonsequenzierung erfasste Anzahl der Sequenzen und OTUs sowie Diversitätsindices verschiedener Hemmpuben.	86
Tabelle 36: Phylogenetische Einordnung der Archaea-spezifischen DGGE-Signale mittels Klonen aus Anlage B.	91
Tabelle 37: Taxonomische Zuordnung der archaeellen DGGE-Signale mit Hilfe spezifischer Klone aus Anlage C.	91
Tabelle 38: Durch Klonierung erfasste Diversität der <i>Methanobacteriales</i> in Anlage B und deren Zuordnung zu prominenten DGGE-Signalen.	92
Tabelle 39: Diversität der <i>Methanobacteriales</i> in Anlage C und phylogenetische Einordnung entsprechender DGGE-Signale.	94
Tabelle 40: Durch Archaea-spezifische 454-Amplikonsequenzierung erfasste Anzahl der Sequenzen und OTUs sowie Diversitätsindices der Anlagen B und C.....	97
Tabelle 41: Phylogenetische Zuordnung archaeeller DGGE-Signale mittels spezifischer Klone aus Anlage KA.	100
Tabelle 42: Taxonomische Einordnung archaeeller DGGE-Signale mit Hilfe spezifischer Klone aus Anlage KL.....	101
Tabelle 43: Identifikation <i>Methanobacteriales</i> -spezifischer DGGE-Signale mittels Klonen aus Anlage KA.....	102
Tabelle 44: Taxonomische Zuordnung <i>Methanobacteriales</i> -spezifischer DGGE-Signale mit Hilfe von Klonen aus Anlage KL.....	103
Tabelle 45: Durch Archaea-spezifische 454-Amplikonsequenzierung erfasste Anzahl der Sequenzen und OTUs sowie Diversitätsindices der Anlagen KA und KL.....	106
Tabelle 46: Durch Bacteria-spezifische 454-Amplikonsequenzierung erfasste Anzahl der Sequenzen und OTUs sowie Diversitätsindices der untersuchten Anlagen.....	108
Tabelle 47: Durch Bacteria-spezifische 454-Amplikonsequenzierung erfasste Anzahl der Sequenzen und OTUs sowie Diversitätsindices der verschiedenen Hemmpuben.....	111
Tabelle A1: NH_4^+ -N-Konzentrationen [g CaCO_3/l] der Proben während des ersten Ammonium-Toxizitäts-Versuches.	175
Tabelle A2: pH-Werte der Proben während des ersten Ammonium-Toxizitäts-Versuches.....	176
Tabelle A3: FOS-Konzentrationen [g $\text{HAc}_{\text{eq}}/\text{l}$] der Proben während des ersten Ammonium-Toxizitäts-Versuches.	177
Tabelle A4: TAC-Konzentrationen [g CaCO_3/l] der Proben während des ersten Ammonium-Toxizitäts-Versuches.	179
Tabelle A5: NH_4^+ -N-Konzentrationen [g CaCO_3/l] der Proben während des zweiten Ammonium-Toxizitäts-Versuches.	181
Tabelle A6: pH-Werte der Proben während des zweiten Ammonium-Toxizitäts-Versuches.	182
Tabelle A7: FOS-Konzentrationen [g $\text{HAc}_{\text{eq}}/\text{l}$] der Proben während des zweiten Ammonium-Toxizitäts-Versuches.	183
Tabelle A8: TAC-Konzentrationen [g CaCO_3/l] der Proben während des zweiten Ammonium-Toxizitäts-Versuches.	184

Tabelle A9: pH-Werte der Proben während des ersten Versauerungsversuches.	185
Tabelle A10: Essigsäure-Konzentrationen [g/l] der Proben während des ersten Versauerungsversuches.	185
Tabelle A11: Propionsäure-Konzentrationen [g/l] der Proben während des ersten Versauerungsversuches.	186
Tabelle A12: FOS-Konzentrationen [g/l] der Proben während des ersten Versauerungsversuches. ...	186
Tabelle A13: FOS/TAC-Quotient der Proben während des ersten Versauerungsversuches.	187
Tabelle A14: pH-Werte der Proben während des zweiten Versauerungsversuches.	188
Tabelle A15: Essigsäure-Konzentrationen [g/l] der Proben während des zweiten Versauerungsversuches.	189
Tabelle A16: Propionsäure-Konzentrationen [g/l] der Proben während des zweiten Versauerungsversuches.	190
Tabelle A 17: FOS-Konzentrationen [g/l] der Proben während des zweiten Versauerungsversuches.	191
Tabelle A 18: FOS/TAC-Quotient der Proben während des zweiten Versauerungsversuches.	192
Tabelle A19: Mittels Archaea-spezifischer 16S-Aplikonsequenzierung ermittelte Relative Abundanzen [%] der einzelnen Genera (nach RDP-Klassifizierung) im Verlauf von Prozessstörungen.	193
Tabelle A20: Mittels Bacteria-spezifischer 16S-Aplikonsequenzierung ermittelte Relative Abundanzen [%] der einzelnen Phyla (nach RDP-Klassifizierung) in den verschiedenen Anlagen.	194
Tabelle A21: Mittels Bacteria-spezifischer 16S-Aplikonsequenzierung ermittelte Relative Abundanzen [%] der einzelnen Familien (nach RDP-Klassifizierung) innerhalb der Ordnung der <i>Clostridiales</i> in den verschiedenen Anlagen.	195
Tabelle A22: Mittels Bacteria-spezifischer 16S-Aplikonsequenzierung ermittelte Relative Abundanzen [%] der einzelnen Phyla (nach RDP-Klassifizierung) im Verlauf von Prozessstörungen.	196
Tabelle A23: Mittels Bacteria-spezifischer 16S-Aplikonsequenzierung ermittelte Relative Abundanzen [%] der einzelnen Familien (nach RDP-Klassifizierung) innerhalb der Ordnung der <i>Clostridiales</i> im Verlauf von Prozessstörungen.	197

1 EINLEITUNG

1.1 Anaerobe Fermentation

Als anaerobe Fermentation wird der mikrobielle Abbau komplexer organischer Substanz im anaeroben Milieu bezeichnet, an dessen Ende die Produktion von Biogas steht. Die Hauptbestandteile dieses Biogases sind Methan und Kohlenstoffdioxid, es enthält in kleinen Mengen aber auch weitere Gase, wie Stickstoff, Sauerstoff, Schwefelwasserstoff und andere flüchtige organische Verbindungen (1). Zu finden ist der Prozess der anaeroben Fermentation in Umgebungen, die sich durch das Fehlen anorganischer Elektronenakzeptoren wie Sauerstoff, Nitrat, Sulfat, Mangan sowie Eisen-(III) auszeichnen (2) (3). Zu den wichtigsten natürlichen Ökosystemen, in denen die anaerobe Fermentation abläuft, zählen unter anderem Reisfelder, Gewässersedimente, Sümpfe und die Verdauungstrakte von Wiederkäuern oder Insekten (4). Der Abbau komplexer Biomasse zu Biogas gliedert sich in vier miteinander verknüpfte Teilschritte, bei denen eine Vielzahl verschiedener Mikroorganismen involviert ist (Abbildung 1). Dabei fungiert jeweils das Produkt eines Teilschrittes als Substrat des nächsten Schrittes, sodass die gesamte Abbaurrate nur dann ihr Maximum erreichen kann, wenn jedes einzelne Glied der Kette optimal verläuft (5) und der langsamste Schritt die Geschwindigkeit des gesamten Prozesses bestimmt (6). Im Folgenden werden diese einzelnen Prozesse der anaeroben Fermentation näher beschrieben.

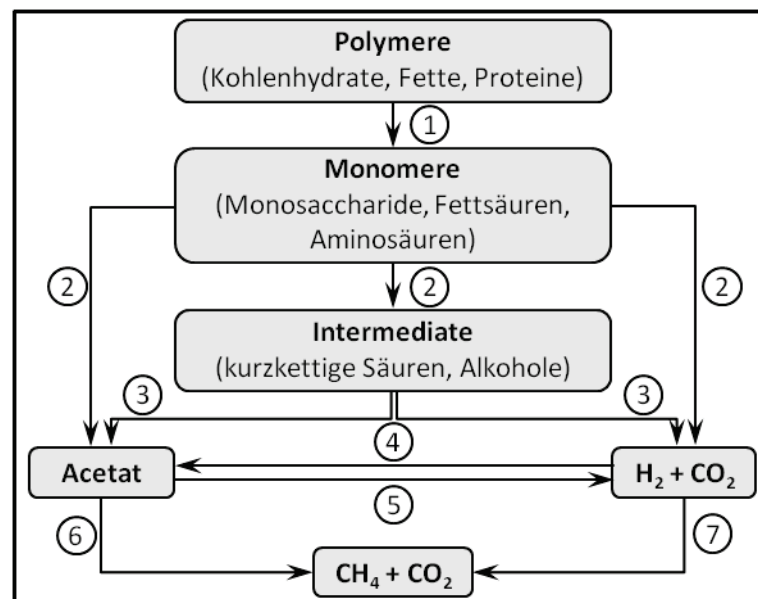


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Ablaufs der anaeroben Fermentation.

Während des anaeroben Abbaus organischen Materials sind folgende Mikroorganismen beteiligt: (1) hydrolytische Bakterien, (2) primäre Fermentierer, (3) sekundäre Fermentierer, (4) Acetogene, (5) Syntrophe Acetat Oxidierer, (6) acetiklastische Methanogene, (7) hydrogenotrophe Methanogene.

1.1.1 Hydrolyse und Acidogenese (primäre Fermentation)

Die Hydrolyse ist der initiale Schritt der anaeroben Fermentation organischer Substanz, bei dem komplexe Biopolymere (Proteine, Fette und Kohlenhydrate) durch hydrolytische Spaltung in deren Oligo- und Monomere (Aminosäuren, langkettige Fettsäuren und Glycerin sowie Monosaccharide) abgebaut werden. Eine Vielzahl verschiedener obligat oder fakultativ anaerober, hydrolytischer Bakterien ist durch die Sekretion von Exoenzymen (wie Proteasen, Lipasen und Cellulasen) an diesem Prozess beteiligt (7). In Biogasanlagen sind insbesondere die Phyla *Firmicutes* (vor allem die Gattungen *Clostridium* und *Butyrivibrium*), *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* und *Chloroflexi* zu nennen (8) (9), deren Diversität insbesondere in Abhängigkeit vom eingesetzten Substrat (10) (11) (12) und der Prozesstemperatur (13) (14) (15) variiert. Daneben beeinflusst die Substratzusammensetzung maßgeblich die Geschwindigkeit der Hydrolyse. Während Zucker sehr einfach zu hydrolysieren sind, verläuft der Abbau von Cellulose, Hemicellulose und Lignin sehr langsam (16). Aus diesem Grund wird die Hydrolyse vor allem in NawaRo-Anlagen (d. h. Anlagen, die mit nachwachsenden Rohstoffen als Substrat betrieben werden) meist als ratenlimitierender Schritt betrachtet (17) (18).

Im Rahmen der sich anschließenden Acidogenese setzen verschiedene säurebildende Bakterien die aus der Hydrolyse resultierenden löslichen Verbindungen durch eine Vielzahl von Gärungsprozessen weiter um. Die typischen Produkte dieser Fermentation sind kurzkettige, organische Säuren (wie Acetat, Butyrat und Propionat), Alkohole (wie Ethanol) sowie Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid, wobei sich deren genaue Zusammensetzung je nach eingesetztem Substrat unterscheidet (7) (19). Diese Produkte werden sekretiert und von den Organismen der folgenden Schritte als Substrat verwendet. Außerdem kommt der Acidogenese eine weitere wesentliche Bedeutung zu: Der Verbrauch von Sauerstoff. Dieser kann in kleinen Mengen in das System eingetragen werden und dessen Verbrauch durch fakultative Anaerobier ist essentiell für das Überleben und die Aktivität der streng anaeroben Organismen (19). Die Acidogenese wird durch die Aktivität einer Vielzahl von Mikroorganismen ermöglicht. Häufig lässt sie sich jedoch nicht klar von der Hydrolyse abtrennen, da beide Stoffwechselwege eng miteinander verknüpft sind und oft in den selben Organismen stattfinden (6) (7).

1.1.2 Acetogenese (sekundäre Fermentation)

Während der Acetogenese werden durch sekundäre Fermentationsprozesse aus den in der Acidogenese gebildeten kurzkettigen Säuren und Alkoholen durch Oxidation die Substrate der Methanogenese, Acetat sowie Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid, gebildet. Die dabei anfallenden

Elektronen werden auf Protonen übertragen, sodass Wasserstoff gebildet wird. Unter Standardbedingungen ist die freie Enthalpie dieser Reaktionen jedoch positiv, sodass sie erst bei einem Wasserstoffpartialdruck von kleiner 10^{-4} atm thermodynamisch begünstigt wird (20). Um diesen niedrigen Wasserstoffpartialdruck zu gewährleisten, ist die sofortige Oxidation des Wasserstoffes durch hydrogenotrophe Methanogene essentiell. Daher leben acetogene Bakterien in obligater Syntrophie mit hydrogenotrophen Methanogenen, durch die der „Interspezies-Wasserstoff-Transfer“ ermöglicht wird (21). Durch die gemeinsame Nutzung der frei werdenden Energie ist es diesen Organismen möglich, sehr nah am thermodynamischen Äquilibrium zu leben (2). Neben der syntrophen Acetatbildung kann auch durch die Reduktion von Kohlenstoffdioxid durch homoacetogene Bakterien Acetat entstehen. Auch der reverse Prozess, die syntrophe Acetat-Oxidation, ist möglich (22) (23) und wurde bereits in Biogasanlagen gefunden (24) (siehe 1.1.3).

Syntrophe acetogene Organismen leben unter strikt anaeroben Bedingungen, wachsen nur sehr langsam und sind schwer kultivierbar (21). Typische Vertreter sind z. B. in den Gattungen *Syntrophobacter*, *Syntrophomonas*, *Syntrophus* und *Pelotomaculum* zu finden (6) (25). Aber auch Organismen der Gattung *Clostridium* sind zur sekundären Fermentation befähigt (6).

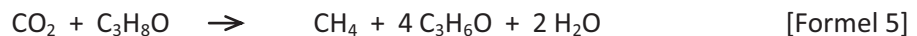
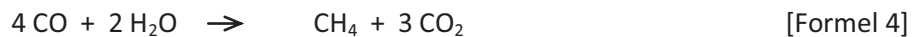
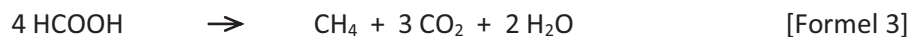
1.1.3 Methanogenese

Im finalen Schritt der anaeroben Fermentation, der Methanogenese, wird insbesondere aus Acetat, sowie aus Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid durch strikt anaerobe, methanogene Archaeen Methan gebildet. Dabei können prinzipiell drei Wege der Methanbildung unterschieden werden. Ein erster Weg ist die acetiklastische Methanogenese, bei der Acetat als Substrat verwendet wird. Dieses wird gespalten und die Methylgruppe zu Methan reduziert, während die Carbonylgruppe zu Kohlenstoffdioxid oxidiert wird [Formel 1] (4). In dieser Reaktion fungiert demnach Acetat sowohl als Elektronendonator als auch als Elektronenakzeptor. In einigen Biogasanlagen konnte außerdem die Bildung von Methan aus Acetat durch syntrophe Acetat Oxidation gezeigt werden, wobei Acetat zunächst durch syntrophe Bakterien in Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid metabolisiert und anschließend hydrogenotroph Methan gebildet wird (26) (27) (28).

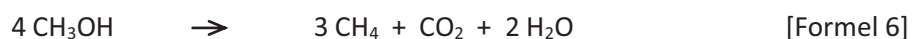


In einem zweiten Weg, der hydrogenotrophen Methanogenese, kann Methan durch Reduktion aus Kohlenstoffdioxid gebildet werden, wobei Wasserstoff als Elektronendonator dient [Formel 2] (4). Viele Methanogene können diese Reaktion auch mit Formiat anstelle von Kohlenstoffdioxid als Elektronendonator durchführen [Formel 3]. Dabei wird das Formiat mit Hilfe einer F_{420} abhängigen

Formiat-Dehydrogenase zu Kohlenstoffdioxid oxidiert (29). Seltener tritt auch die Bildung von Methan aus Kohlenstoffmonoxid [Formel 4] und die Verwendung zweiwertiger Alkohole (wie 2-Propanol) als Elektronendonator [Formel 5] auf (30) (31).



Einen dritten Weg stellt die methylotrophe Methanogenese dar [4]. Dabei werden drei Methylgruppen methylierter Substrate (wie Methylamine oder methylierte Sulfide) zu Methan reduziert. Die dafür benötigten Elektronen stammen aus der schrittweisen Oxidation (reverse hydrogenotrophe Methanogenese) einer weiteren Methylgruppe zu Kohlenstoffdioxid (Disproportionierung). Beispielhaft ist hier die Reaktion für Methanol gezeigt [Formel 6] (4).



In natürlicher Umgebung werden etwa 70 % des Methans über den acetiklastischen Weg und nur ca. 30 % über den hydrogenotrophen Weg gebildet (19)(4). In Biogasanlagen kann sich das Verhältnis beider Wege jedoch deutlich unterscheiden. Insbesondere in Anlagen mit hoher Raumbelastung und geringer Verweilzeit, wie beispielsweise in landwirtschaftlichen Biogasanlagen, scheinen hydrogenotrophe Organismen zu dominieren (6) (32). In diesem Fall spielt auch die syntrophe Acetat-Oxidation eine wesentliche Rolle (28).

Während in den meisten Anlagen des landwirtschaftlichen Betriebes die Hydrolyse als geschwindigkeitsbestimmender Schritt angesehen wird (siehe 1.1.1), kann bei der Verwendung leicht vergärbare Substrate die Methanogenese Raten-limitierend werden. Dabei besteht zudem die Gefahr der Übersäuerung durch sich schnell vermehrende Fermentierer (16).

Auf typische methanogene Organismen wird im Kapitel 1.3 näher eingegangen.

1.2 Technische Anwendung der Methanogenese- der Biogasprozess

1.2.1 Allgemeine Aspekte der Biogasgewinnung

Aufgrund der stetig steigenden Bevölkerungsdichte und des damit verbundenen wachsenden Energiebedarfes sieht sich die moderne Gesellschaft mit zwei Problemen konfrontiert: Der Knappheit

fossiler Brennstoffe und der Emission klimawirksamer Gase, die zu einer Beschleunigung des Treibhauseffektes führen. Um dieser Entwicklung entgegen zu treten, hat in den letzten Jahren die alternative Energiegewinnung aus regenerativen Ressourcen immer mehr an Bedeutung gewonnen. Dementsprechend soll der Anteil regenerativ erzeugter Energie am Gesamtenergiebedarf erhöht (33) und außerdem die Emission von Treibhausgasen in Deutschland bis 2020 um 40 % und bis 2050 um 80-95 % im Vergleich zu 1990 reduziert werden (34). Im Jahr 2014 stammten bereits 25,8 % des deutschlandweit erzeugten Stromes aus erneuerbaren Energiequellen. Knapp ein Drittel davon entfiel auf Energie aus Biomasse (Abbildung 2).

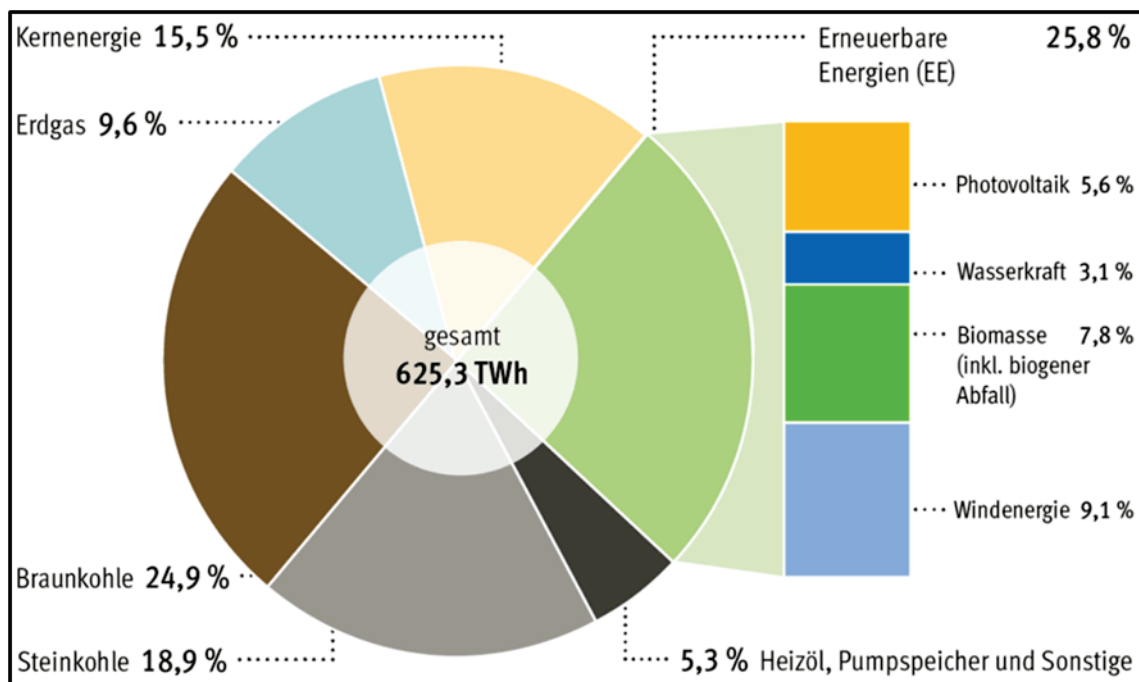


Abbildung 2: Zusammensetzung der deutschlandweiten Brutto-Stromerzeugung im Jahr 2014.
Abbildung übernommen aus (35).

Die Erzeugung von Strom mit Hilfe von Biogasanlagen stellt eine vielversprechende Alternative zu fossilen Brennstoffen dar. Neben der nachhaltigen Stromgewinnung und verminderten Treibhausgasemission ermöglicht diese Methode außerdem eine kostengünstige Abfallbehandlung und Inaktivierung von Pathogenen (36). Außerdem kann der zurückbleibende Gärrest wegen des hohen Stickstoff-, Phosphat- und Kaliumgehaltes als Dünger eingesetzt werden (6) (37). Aufgrund dieser Vorteile der Biogasgewinnung haben in den letzten Jahren der Bau und die Nutzung von Biogasanlagen deutschlandweit deutlich zugenommen. Mit dem Stromeinspeisungsgesetz (StrEG) von 1991 und dessen Neufassung im Jahr 1994 wurde erstmals eine Vergütung der Stromproduktion aus Biogas gesetzlich verankert. Weitere politische Initiativen, wie die Verabschiedung des Erneuerbare-Energien-Gesetzes (EEG) und der EU-Richtlinie 2001/77/EG zur Förderung von erneuerbaren Energien, unterstützten diese Entwicklung weiter. In der Neufassung des EEG aus dem

Jahr 2004 wurde außerdem ein Bonussystem für Verwendung nachwachsender Rohstoffe (NawaRo) für die Biogasproduktion eingeführt (38). Dementsprechend ist die Anzahl der Biogasanlagen in Deutschland von 139 im Jahr 1992 auf 8726 im Jahr 2014 gestiegen (39). Da der Aufbau und die Prozessführung einzelner Biogasanlagen dabei sehr unterschiedlich sein können, soll im Folgenden auf die wichtigsten Prozessparameter der hier untersuchten Anlagen eingegangen werden.

1.2.2 Prozessparameter

1.2.2.1 Anlagenbetrieb

Im Betrieb von Biogasanlagen wird grundsätzlich zwischen ein- und zweistufiger Prozessführung unterschieden. Durch die Trennung der Hydrolyse und Fermentation von der Methanogenese in zweistufigen Anlagen wird die Effektivität der Biogasproduktion maximiert, allerdings erfordert dieser Anlagentyp einen hohen technischen Aufwand. Daher kommen häufig auch einstufige Anlagen zum Einsatz, in denen alle Teilschritte der anaeroben Fermentation in einem Reaktor stattfinden. Eine regelmäßige Beschickung dieser Anlagen ermöglicht dabei eine kontinuierliche Gasproduktion. Häufig wird diese phasenweise in mehreren Substratpulsen pro Tag (semi-kontinuierlich) durchgeführt. Um dabei eine gleichmäßige Verteilung des Substrates zu gewährleisten, werden diese Reaktoren ständig durchmischt. Trotz des dadurch bedingten höheren technischen Aufwandes und Energieverbrauches kontinuierlicher Anlagen kommen in Deutschland überwiegend Reaktoren dieses Typs zur Anwendung, da deren Gasertrag deutlich höher gegenüber dem von Batch-Reaktoren ist (38)

Zusätzlich hat die Wahl der Prozesstemperatur einen fundamentalen Einfluss auf den Biogasprozess, da sie sowohl die Diversität als auch Aktivität der Mikroorganismen bestimmt (40) (41) (42). So ist die Hydrolyserate in thermophilen Anlagen höher als in mesophilen. Nachteilig ist jedoch die erhöhte Störanfälligkeit dieser Reaktoren durch die vermehrte Bildung flüchtiger Gase (z. B. Ammoniak) (7) (40), die geringere Toleranz gegenüber Temperaturschwankungen von $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (38) (41) und der erhöhte Energiebedarf durch das Aufheizen der Fermenter (43). Dem entgegen steht die mesophile Anlagenführung, die weniger störanfällig ist und auch Temperaturschwankungen von bis zu $\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ toleriert (38) (41). Trotz der längeren Verweilzeiten, die in diesen Reaktoren nötig sind, werden aufgrund der Prozessstabilität in Deutschland vor allem mesophile Anlagen betrieben (38).

1.2.2.2 Substrate

Das Substrat dient in erster Linie als Nährstoffquelle für die anaeroben Organismen, aber auch als Inokulum und bestimmt damit wesentlich die mikrobielle Population in Biogasanlagen. Wichtiger Einflussfaktor ist dabei die Balance der verschiedenen zugeführten Nährstoffe. Häufig wird in diesem Zusammenhang das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff (C/N-Verhältnis) als Kenngröße angegeben. Liegt dieses im Bereich von 20-30, kann der Biogasprozess störfrei ablaufen. Liegt es deutlich darüber, kann der Kohlenstoffabbau nicht optimal erfolgen, während es bei geringeren C/N-Verhältnissen zur Ammoniakhemmung aufgrund des Stickstoffüberschusses kommen kann (44) (45). Da auch Schwefel (z. B. als Bestandteil von Aminosäuren) und Phosphor (z. B. für die Bildung von ATP) eine wichtige Rolle im mikrobiellen Stoffwechsel spielen, wird das C/N-Verhältnis häufig noch durch diese Makronährstoffe erweitert (6). Ein C/N/P/S-Verhältnis von 450/15/5/1 bis 600/15/5/3 wird dabei als geeignet für eine ausgewogene Nährstoffversorgung angesehen (44) (45). Daneben müssen auch Mikronährstoffe bzw. Spurenelemente (wie beispielsweise Natrium, Nickel, Eisen, Kobalt, Molybdän, Zink und Selen) mit dem Substrat eingetragen werden (46) (47) (48) (49) (50). Um eine optimale Nährstoffzusammensetzung zu gewährleisten, werden häufig verschiedene Substrate gemeinsam fermentiert (Co-Fermentation).

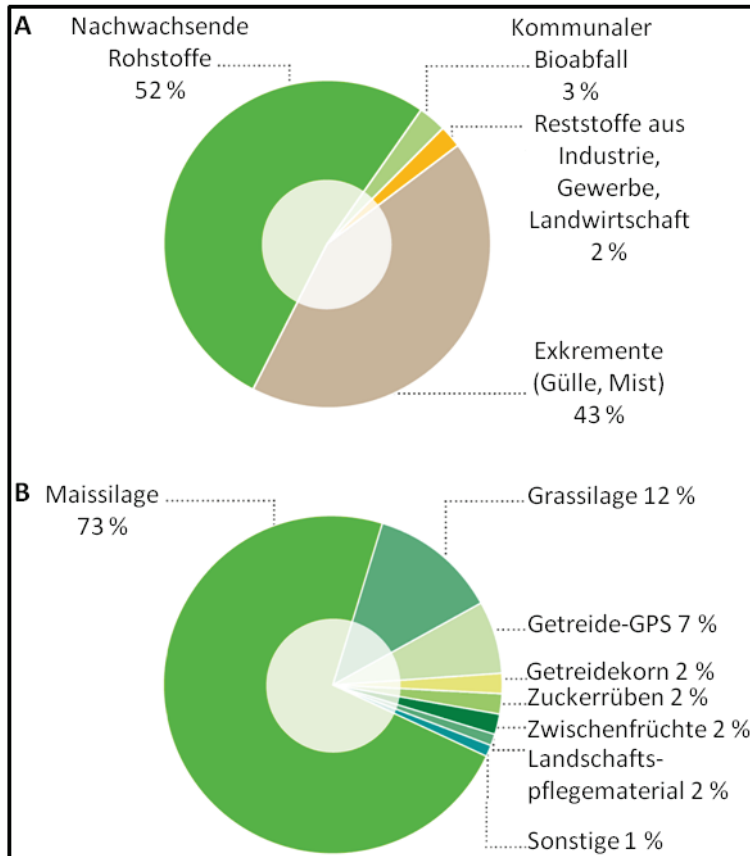


Abbildung 3: Massebezogener Substrateinsatz deutscher Biogasanlagen im Jahr 2014.

Abbildung übernommen aus (35). Dargestellt sind der massenbezogene Einsatz aller (A) bzw. der NawaRo (B) Substrate in deutschen Biogasanlagen.

Die Anzahl derzeit in Biogasanlagen verwendeter Substrate ist sehr groß und beinhaltet insbesondere verschiedene NawaRo, landwirtschaftliche Substrate (Gülle und tierische Exkremete sowie Ernterückstände), industrielle und kommunale Abwässer bzw. Abwasserschlämme und organische Abfälle (16) (51). In Deutschland wird die Mehrzahl an Biogasanlagen mit NawaRo und tierischen Exkrementen betrieben. Insbesondere Maissilage spielt hier eine große Rolle (Abbildung 3). Die Menge und Qualität des entstehenden Biogases kann dabei in Abhängigkeit vom eingesetzten Substrat sehr unterschiedlich sein (Abbildung 4).

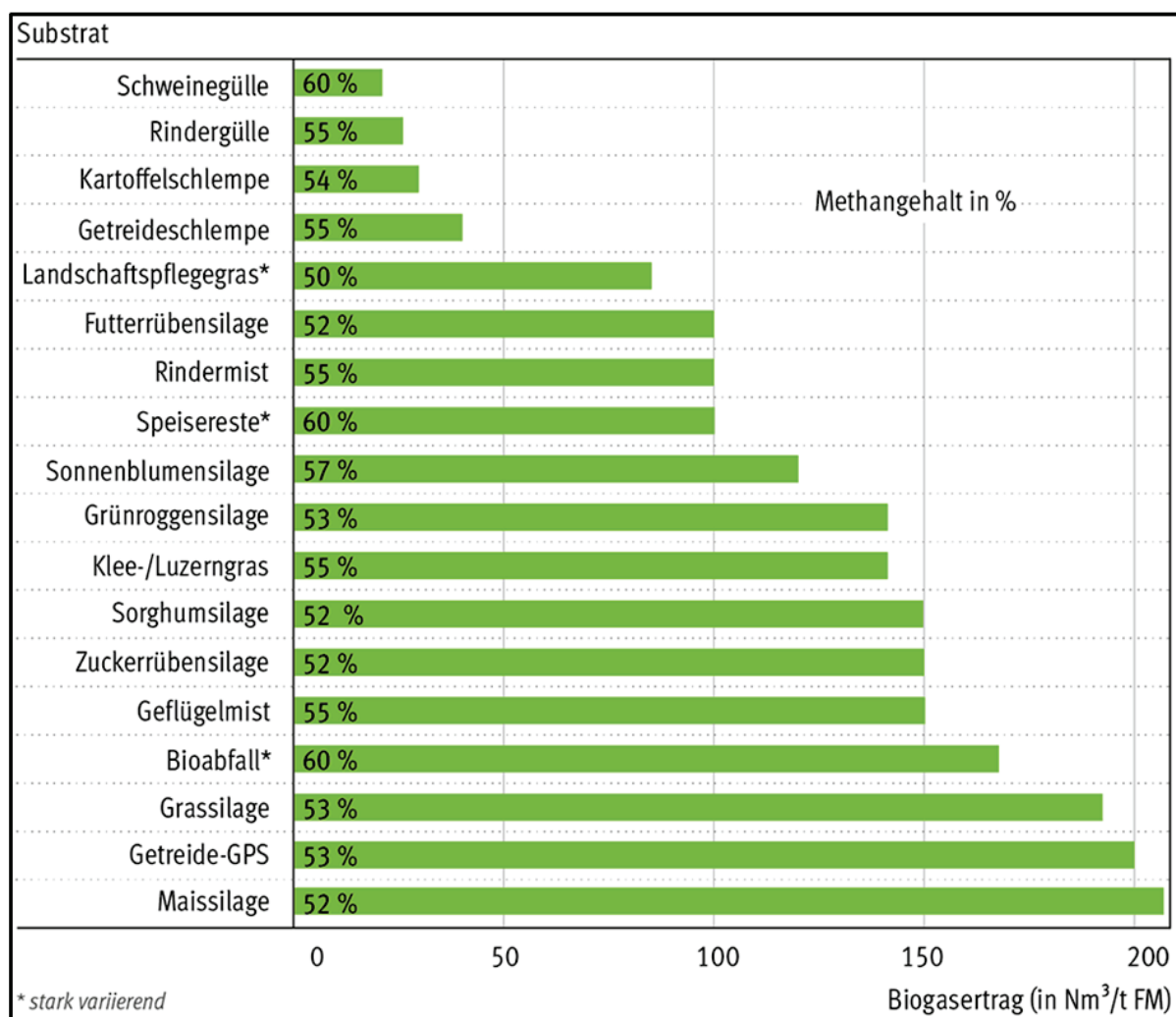


Abbildung 4: Gasausbeuten verschiedener Substrate.

Abbildung übernommen aus (35). Nm³: Normkubikmeter (Kubikmeter eines Gases unter Normalbedingungen); FM: Frischmasse des eingesetzten Substrates.

Die Nutzung von Maissilage ist insbesondere aufgrund der hohen potentiellen Biogasausbeute attraktiv. Als Co-Substrat und Inokulum werden häufig verschiedene flüssige tierische Exkremete (vor allem Rindergülle) verwendet (52). Diese verbessern die Pumpeigenschaft des Substrates und bringen neben den Mikroorganismen auch Spurenelemente in den Biogasprozess ein, die bei der

alleinigen Fermentation von NawaRo nicht ausreichend zur Verfügung stehen (38) (47) (53). Durch den Zusatz von hydrolytischen Enzymen zum Substrat kann der Biogasertrag zusätzlich erhöht werden, da so der Abbau von Polysacchariden verbessert wird (37).

Neben den NawaRo-Anlagen gewinnt auch die anaerobe Fermentation von Abwasserschlämmen zunehmend an Bedeutung. Traditionell werden Klärschlämme in aeroben Belebtschlammbecken behandelt und stabilisiert. Die anaerobe Fermentation des Schlammes kann dem gegenüber jedoch eine Reihe von Vorteilen bieten: Das Volumen des Klärschlammes und damit die Kosten für dessen Entsorgung werden verringert, Pathogene werden inaktiviert, Schadstoffe und toxische Substanzen werden abgebaut und damit die Qualität des Klärschlammes verbessert, der Energieverbrauch wird reduziert, da keine Belüftung notwendig ist und das entstehende Biogas kann zur Energiegewinnung genutzt werden (36) (54) (55). Dementsprechend hat die Stromgewinnung aus Klärgas seit 2008 stetig zugenommen. Dennoch kommt der Biogasproduktion aus Klärschlamm in Deutschland bisher nur eine untergeordnete Bedeutung zu und im Jahr 2013 stammte lediglich ca. 1 % des bereitgestellten Stromes aus erneuerbaren Energien von Klärgas (56).

1.2.2.3 Prozessstörung

Am Prozess der anaeroben Fermentation ist eine Vielzahl von Mikroorganismen beteiligt, die sich in ihrer Physiologie, Nährstoffansprüchen und Sensitivität gegenüber Umweltveränderungen stark unterscheiden (57). Für eine stabile Koexistenz aller beteiligten Organismen ist es daher von großer Bedeutung, die Bedingungen in Biogasanlagen entsprechend auszubalancieren. Beispielhaft dafür ist die Wahl des pH-Wertes. Während die hydrolisierenden und acidogenen Bakterien ein pH-Optimum zwischen 4,5 und 6,3 besitzen, ist ein pH-Wert zwischen 6,8 und 7,5 für acetogene und methanogene Mikroorganismen optimal. Da aber vor allem letztere besonders pH-sensitiv reagieren, wird in einstufigen Biogasanlagen üblicherweise ein neutraler pH-Wert eingestellt (44). Unter normalen Bedingungen stellt sich der pH-Wert in Biogasanlagen selbständig durch die Produktion von Säuren auf der einen und der Bildung von Ammonium und Kohlenstoffdioxid (das im Gleichgewicht mit Hydrogencarbonat steht) auf der anderen Seite ein (16) (58) (59). Ist das Gleichgewicht dieser Prozesse gestört, kommt es zu Veränderungen des pH-Wertes, die häufig zu Prozessstörungen führen. Die Gründe dafür können sehr vielfältig sein. Eine häufige Ursache für die Versauerung des Fermenters ist Überfütterung, die mit einer starken Erhöhung der Raumbelastung einher geht. Diese hat eine Akkumulation der flüchtigen organischen Säuren (FOS) zur Folge, da die syntrophen und methanogenen Organismen deutlich langsamer wachsen als die hydrolytischen Bakterien und somit produzierte Säuren nicht mehr abgebaut werden können (6) (60). In zu hoher Konzentration können FOS außerdem die methanogenen Mikroorganismen hemmen, sodass die

Methanproduktion zum Erliegen kommt. Zudem kann das Fehlen von Spurenelementen durch eine Hemmung der Methanogenen zur Anreicherung von Säuren führen (6). Sinkt der pH-Wert infolge akkumulierter Säuren ab, können im Folgenden auch die hydrolytischen und acetogenen Bakterien gehemmt werden (36) (61). Um eine Versauerung zu vermeiden, muss die Raumbelastung zumindest vermindert oder die Fütterung eingestellt werden, sodass zunächst vorhandene Säuren abgebaut werden können (6) (16). Außerdem kann die Alkalität durch Zugabe von Kalium- oder Natriumhydrogenphosphat sowie Kalk erhöht werden (59) (58). Um eine beginnende Versauerung frühzeitig zu erkennen, ist der pH-Wert jedoch ungeeignet, da sich aufgrund der Pufferkapazität des Fermentermaterials eine Anreicherung von Säuren erst sehr spät im pH-Wert widerspiegelt (44) (62). In der Praxis wird dafür der Quotient aus der Summe aller FOS und dem gesamten anorganischen Carbonat (TAC) herangezogen. Beide Größen werden jeweils durch Titration mit Schwefelsäure bestimmt. Ist der $FOS/TAC \leq 0,3$, kann von einem stabilen Prozess ausgegangen werden. Je nach Substrat kann sich dieser Grenzwert jedoch ändern. So verläuft der Biogasprozess in NawaRo-Anlagen in der Regel auch bei einem FOS/TAC zwischen 0,4 und 0,6 noch störungsfrei (62) (63). Um genau feststellen zu können, welche Organismengruppe funktionell beeinträchtigt ist, empfiehlt sich außerdem eine detaillierte Untersuchung einzelner prozessrelevanter Säuren (63).

Eine zweite häufige Ursache für Prozessstörungen ist die Anreicherung von Ammonium-Stickstoff. Im Fermentermaterial bildet sich ein Gleichgewicht zwischen Ammoniak und den geladenen Ammoniumionen. Während dieses Gleichgewicht bei geringen Ammonium-Stickstoffkonzentrationen zur Stabilität des pH-Wertes beiträgt und Ammoniumionen als Stickstoffquelle dienen, können bei erhöhten Konzentrationen insbesondere die Methanogenen gehemmt werden. Toxisch wirkt dabei lediglich Ammoniak (7) (64). Da bei steigendem pH-Wert und bei erhöhter Temperatur das Gleichgewicht in Richtung Ammoniak verschoben wird, tragen beide Faktoren zusätzlich zu einer erhöhten Toxizität bei (6) (64) (65). Aus diesem Grund sind Reaktoren mit thermophiler Prozessführung häufiger von Prozessinstabilität betroffen (65). Da sowohl die Temperatur als auch der pH-Wert sowie andere einflussnehmende Prozessparameter in Biogasanlagen variieren, ist es nicht möglich, einen generell gültigen Grenzwert zu bestimmen, ab dem toxische Effekte auftreten (64). Außerdem sind die Mikroorganismen in der Lage, sich bei langsamer Steigerung der Ammoniumkonzentration anzupassen (66) (67). In verschiedenen Untersuchungen wurden inhibitorische Effekte bei Ammonium-Stickstoff-Konzentrationen zwischen 1,5-14 g/l beobachtet (7) (65). Tritt eine Ammonium-Hemmung auf, werden vor allem die Methanogenen gehemmt. Infolge dessen werden, ähnlich wie bei der Versauerung, produzierte Säuren nicht weiter metabolisiert und reichern sich an. Dieser Prozess kann bei geringer Inhibition der Ammonium-Intoxikation durch ein Absinken des pH-Wertes entgegen wirken (64) (65). Bei zu hoher oder plötzlich steigender Ammonium-Stickstoff-Konzentration ist diese Selbstregulation

jedoch nicht mehr möglich und es kommt zur Störung des Biogasprozesses (64). Um eine solche Prozessstörung zu vermeiden, ist es insbesondere bei der Fütterung proteinreicher Substrate, wie Gras- und Kleesilage sowie Hühnermist, essentiell, die Ammonium-Stickstoff-Konzentration ständig zu überprüfen (6) (45) (62). Bei einem Anstieg der Ammonium-Stickstoff-Konzentration kann außerdem durch das Aussetzen der Fütterung bzw. dem Zusatz von Biomasse mit geringem Stickstoff-Gehalt zum Substrat eine Störung vermieden werden (45).

1.3 *Methanogene Archaea*

Die einzigen bisher bekannten Organismen, die Methan in nennenswerten Mengen als Endprodukt ihres Energiestoffwechsels produzieren, gehören der Gruppe der strikt anaeroben methanogenen Archaea an, die dem Phylum *Euryarchaeota* zugeordnet werden. Bisher sind sieben methanogene Ordnungen bekannt: *Methanopyrales*, *Methanococcales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanocellales* und *Methanomassiliicoccales*. Methanogene sind hauptsächlich in Umgebungen zu finden, in denen thermodynamisch günstigere Elektronenakzeptoren wie Sauerstoff, Nitrat, Eisen oder Sulfat fehlen, wie es beispielsweise in marinen und limnischen Gewässersedimenten, Reisfeldern, humanen und tierischen Verdauungstrakten aber auch Biogasanlagen der Fall ist (4).

Morphologisch sind die methanogenen Archaeen sehr divers. So können sie in regelmäßigen und unregelmäßigen Kokken (*Methanococcales*, *Methanomicrobiales*), langen und kurzen Stäbchen (*Methanobacteriales*, *Methanopyrales*), Spirillen (*Methanospirillum*), langen Filamenten (*Methanosaetaceae*) oder auch großen Aggregaten, beispielsweise Sarcinen, (*Methanosarcinales*) vorkommen (19) (2). Auch physiologisch sind die Methanogenen sehr vielfältig. Die meisten methanogenen Archaea wachsen in mesophilen oder thermophilen Temperaturbereichen (2) (4). Allerdings sind auch hyperthermophile [*Methanopyrus kandleri*, (68)] oder psychrophile [*Methanosarcina lacustris*, (69); *Methanogenium frigidum*, (70)] Arten bekannt. Ebenso unterscheiden sich die methanogenen Archaea in ihrer Toleranz gegenüber der vorherrschenden pH-Werten. Während viele Vertreter dieser Gruppe neutrophil im pH-Bereich um 7 gut wachsen können (2), gibt es auch acidotolerante Organismen, die sich auch bei pH-Werten im Bereich von 4-4,5 noch vermehren [*Methanosarcina baltica*, (71); *Methanothermococcus okinawensis*, (72)], sowie alkalophile, deren pH-Optimum bei 9,5 liegt [*Methanosalsum natronophilum*, *Methanocalculus alkaliphilus*, (73)]. Des Weiteren sind bei Methanogenen sehr unterschiedliche Zellwandstrukturen bekannt. Dazu zählen beispielsweise die Pseudomureinzellwände der *Methanobacteriales* und *Methanopyrales* und die S-Layer-Zellwände der *Methanosarcinales* (74) und *Methanococcales* (4). *Methanoplanus* sp. hingegen besitzen Glycoproteinzellwände (75).

Allen methanogenen Archaea gemeinsam ist jedoch der namensgebende Mechanismus der Methanogenese, der die Energiekonservierung durch die Produktion von Methan erlaubt. Organismen der Ordnung *Methanosarcinales* sind dabei die bisher einzigen bekannten Organismen, die Acetat als methanogenes Substrat nutzen können. Zu unterscheiden sind dabei Organismen der Familie *Methanosaetaceae*, die ausschließlich Acetat als Substrat nutzen, und der *Methanosarcinaceae*, die daneben auch andere Kohlenstoffquellen, wie Kohlenstoffdioxid, Kohlenstoffmonoxid und methylierte Verbindungen für ihren Stoffwechsel nutzen können (76). Der Weg der hydrogenotrophen Methanogenese ist sehr weit verbreitet und in jeder Ordnung der methanogenen Archaea zu finden. Dabei sind einige Organismen sehr spezialisiert und können ausschließlich Kohlenstoffdioxid zu Methan reduzieren. Dazu gehören z. B: Organismen der Genera *Methanothermus*, *Methanopyrus*, oder *Methanocaldococcus* (4) (68) (77). Die meisten Hydrogenotrophen sind jedoch auch in der Lage, Formiat als Kohlenstoffquelle zu nutzen (2) (4). Die Genera *Methanogenium* und *Methanoculleus* können außerdem zweiwertige Alkohole für ihren Metabolismus nutzen (31) (78) (79).

Zur methylotrophen Methanogenese sind lediglich Organismen der Ordnung *Methanosarcinales* befähigt (4). Die wichtigsten physiologischen Charakteristika der Methanogenen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Physiologische Eigenschaften der einzelnen Ordnungen methanogener Archaea.

Methanogene Ordnung	Kohlenstoffquellen	Temperatur-Bereich [°C]	pH-Bereich	Referenzen
<i>Methanosarcinales</i>	Acetat, H ₂ + CO ₂ , CO, Methanol, Methylamine, Methylmercaptopropionate, Dimethylsulfide	1-70	4,0 - 10,0	(4) (76) (80) (81) (82)
<i>Methanomicrobiales</i>	H ₂ + CO ₂ , Formiat, Ethanol ¹ , 2-Propanol ² , 2-Butanol ² , Cyclopentanol ²	15-60	6,1 - 8,0	(4)(78) (83)(82)
<i>Methanobacteriales</i>	H ₂ + CO ₂ , Formiat, methylierte C1-Verbindungen + H ₂ ³	20-88	5,0 - 8,8	(4) (82) (84)
<i>Methanococcales</i>	H ₂ + CO ₂ , Formiat	<20-88	4,5 - 9,8	(4) (82) (85)
<i>Methanopyrales</i>	H ₂ + CO ₂	84-110	5,5 - 7,0	(68) (86) (87)
<i>Methanocellales</i>	H ₂ + CO ₂ , Formiat	25-40	6,5 - 7,8	(88)

Verändert nach (2).

¹Nur *Methanogenium* sp.

²Nur *Methanoculleus* sp.

³Nur *Methanosphaera* sp.

Aufgrund der fundamentalen Bedeutung der archaeellen Population für eine stabile Methanoproduktion ist die Zusammensetzung der methanogenen Biozönose in Biogasanlagen derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Dennoch ist es bisher nicht möglich, anhand vorgegebener Prozessparameter die Schlüsselorganismen der Methanogenese vorherzusagen, da in verschiedenen Studien bisher sehr unterschiedliche archaeelle Gemeinschaften detektiert wurden (89) (14) (90). Bei einer Analyse von 21 Biogasanlagen, die mit verschiedenen Substraten beschickt wurden, konnte gezeigt werden, dass vor allem die Art des Substrates und die gewählte Prozesstemperatur die archaeelle Biozönose bestimmt (15). Auch bei der anaeroben Verwertung von Stallmist verschiedener Milchbetriebe konnten in einer Metagenom-gestützten Analyse abhängig von der Herkunft des Substrates deutliche Unterschiede in der methanogenen Population detektiert werden (91). Neben der Wahl des Substrates und der Prozesstemperatur bestimmen jedoch auch eine Reihe anderer Faktoren die mikrobielle Zusammensetzung in Biogasanlagen. So kann beispielsweise auch die Wahl des Reaktortyps bestimmend für die archaeelle Biozönose sein (92) (93).

Aufgrund der Komplexität verschiedener Einflussfaktoren in Biogasanlagen ist eine genaue Vorhersage der methanogenen Population derzeit nicht möglich und es bedarf weiterer Untersuchungen.

1.4 Molekularbiologische Analyseverfahren zur Charakterisierung komplexer mikrobieller Biozönosen

Über viele Jahrzehnte hinweg wurden mikrobielle Biozönosen mit Hilfe der „klassischen Mikrobiologie“ untersucht. Diese beinhaltet die Isolation und Kultivierung von Mikroorganismen außerhalb ihrer natürlichen Umgebung und anschließend deren mikroskopische und physiologische Charakterisierung. Trotz umfangreicher Weiterentwicklung verschiedener Kultivierungstechniken und Medien kann ein Großteil der Mikroorganismen jedoch bis heute nicht kultiviert werden. Es wird angenommen, dass weniger als 1 % der in der Umwelt vorkommenden Mikroorganismen mit klassischen Methoden kultivierbar sind (94). Außerdem bevorzugen die durch die Zusammensetzung des Mediums und die Art der Kultivierung definierten Bedingungen (wie Temperatur, pH, vorhandene Kohlenstoff- und Stickstoffquelle sowie Elektronendonatoren und -akzeptoren, Kultivierungsdauer und die Sauerstoffversorgung) einzelne Mikroorganismen, sodass keine Rückschlüsse auf die Abundanz und ökologische Relevanz eines kultivierten Organismus in dessen natürlicher Umwelt gezogen werden können. Aufgrund der Einschränkungen, die die Kultivierung von Mikroorganismen mit sich bringt, finden in der mikrobiellen Ökologie zunehmend „Kultur-unabhängige Methoden“ Anwendung, bei denen intrazelluläre Biomoleküle (Nukleinsäuren, Lipide und Proteine) als Informationsquelle herangezogen und beispielsweise Fluoreszenzmikroskopische

Analysen genutzt werden (95) (96). Im Rahmen dieser Arbeit stehen vor allem DNA-basierte Analysen der mikrobiellen Biozönose in Biogasanlagen im Fokus, die im Folgenden näher charakterisiert werden. Ergänzt werden diese Methoden durch *in situ* Analytik.

1.4.1 Auf isolierter DNA basierende Methodik

Grundlegend für eine verlässliche DNA-basierte Analytik ist die effektive Isolation der DNA aus allen in der Probe enthaltenen Mikroorganismen. Aufgrund der sehr variablen chemischen und biologischen Zusammensetzung von Proben aus komplexen Ökosystemen, wie Biogasanlagen, kann es dabei aber zu Verlusten kommen, die die nachfolgenden Untersuchungen maßgeblich beeinflussen. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren eine Reihe von DNA-Isolationstechniken entwickelt und für sehr unterschiedliches Probenmaterial optimiert und vereinfacht. Dennoch fehlen bis heute speziell entwickelte Methoden zur Isolation von DNA aus Biogasanlagen. Dementsprechend ist die Vergleichbarkeit zwischen Studien, in denen die Diversität in verschiedenen Biogasanlagen erfasst wurde, nur eingeschränkt möglich, da häufig sehr unterschiedliche Verfahren zur Nukleinsäure-Extraktion verwendet werden. So wurden bei der Analyse von Biogasanlagen bisher sehr unterschiedliche Zellzahlen (zwischen 10^8 und 10^{11} Bacteria/ml und zwischen 10^9 und 10^{10} Archaea/ml) und Anzahlen archaeeller Signale bei der Diversitätsuntersuchung mittels denaturierender Gradientengelelektrophorese (DGGE) (zwischen 7 und 20) detektiert (97) (98) (99). Es stellt sich die Frage, ob die z. T. sehr unterschiedlichen mikrobiellen Abundanzen und Mikroorganismenzusammensetzungen tatsächlich auf deutlich variierende Biozönosen in den Biogasanlagen zurückzuführen sind, oder ob möglicherweise die DNA-Isolation die Resultate beeinflusst hat. Die genannten Beispiele zeigen die essentielle Bedeutung der Nukleinsäureextraktion für DNA-basierte Analytik. Nach der Optimierung der DNA-Isolationstechnik erlaubt eine Vielzahl an DNA-basierter Methoden die umfassende Charakterisierung der mikrobiellen Biozönose in komplexen Proben. Sehr häufig wird dabei das 16S rRNA-Gen untersucht, da es universell in allen Domänen des Lebens (Bacteria, Archaea und Eukarya) zu finden ist (100). Aufgrund des Vorhandenseins von hoch konservierten Bereichen, aber auch variabler Regionen, eignet sich die 16S-rDNA sehr gut, um evolutionäre Verwandtschaftsbeziehungen zu erforschen und Organismen phylogenetisch bis zur Art einzuordnen (101). So können auf Grundlage des 16S rRNA-Gens Klonbanken erstellt werden, die durch Sequenzvergleich mit Datenbanken die Identifikation von Einzelorganismen aus Umweltproben ermöglichen. Die Komplexität und Dynamik der mikrobiellen Biozönose kann durch verschiedene „fingerprint-Methoden“ visualisiert werden. Dazu zählt unter anderem die DGGE-Analyse, bei der amplifizierte DNA-Fragmente anhand ihres sequenzspezifisch variierenden Denaturierungsverhaltens im Acrylamid-Gel aufgetrennt werden (102), wobei im

Idealfall ein Signal einem Organismus entspricht. Durch die Wahl passender *Primer*-Systeme kann die mikrobielle Population auf sehr unterschiedlichen phylogenetischen Ebenen dargestellt werden (96). Anhand der Gegenüberstellung der DGGE-Profile verschiedener Proben kann mit Hilfe dieser Methode zeitaufgelöst die Dynamik der mikrobiellen Lebensgemeinschaft analysiert werden. Zusätzlich können mittels Sequenzierung der DNA aus prominenten DGGE-Signalen sowie dem Abgleich der Signalpositionen von Klonen der 16S-Klonbank Schlüsselorganismen der Biogasproduktion identifiziert werden. Um die Gesamtpopulation der Mikroorganismen in Proben mit sehr großer Diversität detailliert zu charakterisieren, eignet sich zudem die Hochdurchsatzsequenzierung. Diese Methodik ermöglicht es, durch eine sehr große Vielzahl an Sequenzinformationen auch weniger abundante Mikroorganismen zu identifizieren (96). Dadurch können die Ergebnisse aus Klonbanken und DGGE umfassend ergänzt und die mikrobielle Population sehr tiefschichtig dargestellt werden. Neben der Bestimmung der Identität der in der Probe vorkommenden Mikroorganismen ist auch die Kenntnis deren Abundanz entscheidend, um die Rolle des einzelnen Organismus innerhalb der gesamten Biozönose im Ökosystem beurteilen zu können. Ein wichtiger Bestandteil der DNA-basierten Analytik ist daher die quantitative PCR [qPCR, bzw. *real time* PCR (103)]. Diese Methode ermöglicht durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen die Quantifizierung von DNA während der Amplifikation in Echtzeit, sodass Rückschlüsse auf die Kopienzahl des respektiven DNA-Fragmentes und damit auch auf die Abundanz von Mikroorganismen in den untersuchten Proben gezogen werden können.

1.4.2 *In situ* Analysen

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, unterliegen DNA-basierte Methoden unter anderem dem systematischen Fehler der DNA-Isolation, der die Ergebnisse unter Umständen verfälschen kann. Um den Zwischenschritt der DNA-Extraktion zu umgehen und damit die mikrobielle Population in den Proben direkt zu analysieren, eignen sich *in situ* Methoden. Diese bieten zum einen die Möglichkeit, mit Hilfe unspezifischer DNA-Farbstoffe die Gesamtzellzahl als allgemeinen Biomasseparameter in komplexen Proben fluoreszenzmikroskopisch zu bestimmen (104). Zum anderen kann zur relativen Quantifizierung von Organismen auf verschiedenen taxonomischen Ebenen die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) zum Einsatz kommen. Aufgrund der Möglichkeit zur relativ einfachen und schnellen Identifikation aber auch Quantifizierung einzelner Zellen in ihrer natürlichen Umgebung findet diese Methode sehr häufig Einsatz in der mikrobiellen Ökologie (105) (106) (107) (108). Im Allgemeinen beinhaltet die FISH-Analyse die folgenden vier Arbeitsschritte: i) Fixierung und Permeabilisierung der Zellen, ii) Hybridisierung, iii) Entfernen ungebundener Sonde und iv) Signaldetektion (109). Die Fixierung der Probe ist für die spätere Hybridisierung von

entscheidender Bedeutung, da dadurch zum einen Einzelzellen in ihrer Form stabilisiert und damit der Verlust von Zellen durch Lyse verhindert werden. Zum anderen bewirkt die Fixierung eine Permeabilisierung der Zellwände, sodass das Eindringen der Fluoreszenz-Sonde ermöglicht wird (110). Geeignete Fixative können sich je nach Zusammensetzung des zu untersuchenden Materials jedoch unterscheiden, was insbesondere auf die sehr diversen Zellwandstrukturen in verschiedenen Bakterien und Archaeen zurückzuführen ist (110) (111). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Zellfixierung mit Paraformaldehyd, die sehr häufig für die FISH-Analytik verwendet wird, für gram-positive Bakterien ungeeignet ist, während eine Ethanol-Fixierung dort zu sehr guten Resultaten führt (111). Für die Hybridisierung ist vor allem die Wahl einer geeigneten Sonde von essentieller Bedeutung, wobei häufig auf ribosomale RNA als Zielmolekül zurückgegriffen wird. Neben den bereits genannten Vorteilen der rDNA (siehe 1.4.1) ermöglichen außerdem die hohen Kopienzahlen, in denen Ribosomen in einzelnen Zellen vorkommen, eine natürliche Verstärkung des Fluoreszenzsignals (110). Zudem korreliert die Anzahl der rRNA-Moleküle in einer Zelle, die abhängig von der Wachstumsrate ist, mit der Intensität des Fluoreszenzsignales, sodass nur metabolisch aktive Zellen erfasst werden (96). Dennoch kann ein geringer Anteil an Ribosomen in z. B. sehr kleinen oder wenig aktiven Zellen zu Einschränkungen in der Sensitivität führen (110). Die am weitesten verbreitete Methode zur Verbesserung der FISH-Sensitivität ist die enzymatische Markierung der Oligonukleotidsonden mit anschließender „*catalysed reporter deposition*“ (CARD). Dabei wird eine Meerrettichperoxidase (HRP) kovalent an die Sonde gebunden und ein Fluoreszenzsignal durch Radikalisierung von als Substrat zugefügten fluoreszenzmarkierten Tyramidmolekülen erzeugt (112). Aufgrund des deutlich höheren Molekulargewichts der HRP von ca. 40 kDa im Vergleich zu etwa 500-800 Da der meisten Fluorochrome, muss jedoch die Fixierung angepasst und die Permeabilisierung der Zellen verbessert werden (110) (113). Daher wurden für Proben aus verschiedenen Ökosystemen eine Reihe verschiedener chemischer und enzymatischer Vorbehandlungen etabliert. Dazu gehören insbesondere die Behandlung mit Lysozym (114) (115) bzw. Lysozym in Kombination mit Achromopeptidase (116), aber auch die Inkubation mit Proteinase K (117) (118) und die Behandlung mit Salzsäure (119) wurden beschrieben. Die Effektivität der CARD-FISH mit einer Permeabilisierungsmethode kann dabei in verschiedenen Proben sehr unterschiedlich sein, da einzelne enzymatische bzw. chemische Vorbehandlungen nicht für alle Mikroorganismen geeignet sind (119) (116). Insbesondere Archaea weisen sehr diverse und zu Bakterien deutlich verschiedene Zelloberflächenstrukturen auf, sodass häufig die Permeabilisierung abhängig vom Probenmaterial optimiert werden muss.

1.5 Zielstellung der Arbeit

Die Gewinnung von Energie aus Biogas hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen, da sie, zusammen mit anderen regenerativen Energiequellen, eine ökologisch unbedenkliche Alternative zu fossilen Brennstoffen darstellt. Insbesondere die Nutzung von Energiepflanzen zusammen mit landwirtschaftlichen Abfallprodukten, wie tierischen Exkrementen, findet in Deutschland häufig Anwendung. Essentiell für einen effektiv ablaufenden Biogasprozess ist dabei die Schaffung optimaler Bedingungen für die mikrobielle Biozönose, die für die Umsetzung des Substrates in mehreren Schritten zu Methan verantwortlich ist. In der Praxis wird das in der Regel durch eine regelmäßige Kontrolle der vielfältigen physikochemischen Parameter umgesetzt. Eine genaue Kenntnis der mikrobiellen Gemeinschaft in Biogasanlagen fehlt jedoch häufig. Aus diesem Grund war es Ziel dieser Arbeit, insbesondere die archaeelle Population in Biogasanlagen zu charakterisieren. Aufgrund deren praktischer Bedeutung sollten dabei hauptsächlich mit Maissilage und verschiedenen tierischen Faeces betriebene Anlagen im Vordergrund stehen. Ein Ziel dieser Arbeit sollte dabei zunächst die Etablierung einer geeigneten Methodik sein. Da die Untersuchung komplexer mikrobiologischer Habitate durch Kultivierung oft nur ein sehr unvollständiges Bild über die mikrobielle Gemeinschaft liefert, kamen dazu Kultur-unabhängige Methoden zum Einsatz. Dabei standen zum einen DNA-basierte Analysen, wie DGGE, qPCR und 454-Amplikonsequenzierung, im Vordergrund. Zum anderen waren mikroskopische *in situ* Analysen, wie die Gesamtzellzahlbestimmung sowie die CARD-FISH, wichtiger Bestandteil der Analysen. Diese sollten zunächst anhand des gegebenen Probenmaterials etabliert und optimiert werden. Im Anschluss sollte eine Anlage langfristig durch regelmäßige Beprobung charakterisiert und die Dynamik der archaeellen Biozönose in Zusammenhang mit der Prozessstabilität und den physikochemischen Parametern aufgezeichnet werden. Um die Allgemeingültigkeit der daraus gewonnenen Erkenntnisse zu evaluieren wurden außerdem drei weitere, ähnlich betriebene Anlagen untersucht und die verschiedenen Biozönosen in Abhängigkeit der verwendeten Substratzusammensetzung verglichen. Dem gegenübergestellt wurde außerdem die Zusammensetzung der Archaea in einer mit kommunalem Abwasserschlämmbetriebenen Anlage. Ergänzend sollte zudem beispielhaft die bakterielle Biozönose charakterisiert werden.

Neben der Untersuchung verschiedener Anlagen im Normalbetrieb sollte des Weiteren das Verhalten der mikrobiellen Biozönose im Verlauf von Prozessstörungen analysiert werden. Da es trotz der engen Kontrolle von Biogasanlagen immer wieder zu Störungen im Reaktorbetrieb und daraus resultierend zu Einbußen in der Methanproduktion kommt, ist es von großer Bedeutung, die Auswirkungen auf die Mikroorganismen genau zu kennen, um zukünftig solche Störfälle vermeiden zu können. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit die beiden am häufigsten auftretenden

Prozessstörungen (Ammonium-Intoxikation und Versauerung) im Labormaßstab simuliert und deren Auswirkung auf die mikrobielle Population dargestellt werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Untersuchte Proben

2.1.1 Proben aus Reaktoren im Normalbetrieb

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf industriell genutzte, einstufige Biogasanlagen während ihres Normalbetriebes beprobt. Vier der Anlagen werden mit Maissilage als Hauptsubstrat betrieben (Anlagen A, B, C und KL) und eine mit kommunalem Abwasserschläm (Anlage KA). Die Anlage KA ist dabei in zwei Faultürme unterteilt (F1 und F2). Die Betriebsparameter der einzelnen Anlagen sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Anlagendaten der beprobten Biogasanlagen.

Anlage	Reaktor- volumen [m ³]	Installierte elektrische Leistung [kW _{el}]	pH	Prozess- temperatur [°C]	Prozesshilfsmittel
A	2800	536	7,7-8,2	40	Bioreact Spurenelemente SP, Bioreact Ferro
B	2500	600	7,6-8,1	40	Bioreact Enzyme MAIS PLUS, Bioreact Enzyme GRAS PLUS
C	1650	635	7,5-8,1	47	Bioreact Spurenelemente, Bioreact Enzyme MAIS PLUS, Bioreact Enzyme GRAS PLUS
KL	2400	834	7,5	43	-
KA	10500*	u.	6,5-7,0	40	-

*Das angegebene Reaktorvolumen gibt jeweils die Größe eines einzelnen Faulturmes an. u: unbekannt.

Da die Substratzusammensetzung je nach Qualität und Verfügbarkeit des jeweiligen Rohstoffes schwankt, sind im Folgenden die Fütterungsparameter der einzelnen Proben aufgeführt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Fütterungsprofile, Raumbelastung und hydraulische Verweilzeit der einzelnen untersuchten Proben.

Anlage	Proben- entnahme	Fütterung [t FM/d]									OLR [kg oTS/ m ³ /d]	HRT [d]
		MS	HTK	RM	GR	RG	PM	SG	GS	WK		
A	05.03.2013	25,3	4,5	7,1	-	-	-	-	-	-	4,0	75,7
	08.04.2013	26,3	4,8	7,2	-	-	-	-	-	-	4,1	73,1
	27.05.2013	23,9	4,2	6,6	-	-	-	-	-	-	3,7	80,4
	08.07.2013	24,4	6,1	5,3	-	-	-	-	-	-	4,0	78,5
	29.08.2013	25,0	6,1	5,6	-	-	-	-	-	-	4,2	76,4
	21.10.2013	24,1	5,1	6,1	-	-	-	-	-	-	4,0	79,5
	18.11.2013	24,3	4,9	6,3	-	-	-	-	-	-	4,0	78,9
	06.01.2014	25,0	8,1	3,7	-	-	-	-	-	-	4,1	76,1
	21.01.2014	25,0	8,1	3,7	-	-	-	-	-	-	4,1	76,1
	21.02.2014	23,9	9,6	1,7	-	-	-	-	-	-	4,1	79,6
	20.03.2014	24,7	8,7	2,7	-	-	-	-	-	-	4,1	77,5
	23.04.2014	22,3	7,6	3,1	-	-	-	-	-	-	3,6	84,8
	05.06.2014	23,9	7,9	3,6	-	-	-	-	-	-	4,0	79,0
	17.06.2014	23,9	7,9	3,6	-	-	-	-	-	-	4,0	79,0
	17.07.2014	24,8	9,6	4,3	-	-	-	-	-	-	4,5	72,2
	21.08.2014	25,0	8,3	5,8	-	-	-	-	-	-	4,7	71,7
	18.09.2014	24,5	6,2	6,1	-	-	-	-	-	-	4,4	76,0
	22.10.2014	20,2	4,4	5,2	-	-	-	-	-	-	3,5	93,9
	08.01.2015	24,1	4,1	7,5	-	-	-	-	-	-	3,9	78,4
	09.02.2015	22,3	4,1	6,8	-	-	-	-	-	-	4,0	84,3
	15.04.2015	19,7	3,9	5,3	-	-	-	-	-	-	3,5	96,7
B	05.11.2014	21	3	-	4	6	1	-	-	-	4,4	71,4
	21.01.2015	16	3	-	4	3	1	2	-	-	3,8	86,2
	19.05.2015	21	1	-	2	10	2	5	-	-	4,0	61,0
C	22.05.2014	27,8	-	-	15	15	-	-	-	-	7,1	31,1
	19.11.2014	12	-	-	-	16	2	-	15	-	7,9	27,5
	04.02.2015	15	-	-	8	10	4	-	-	4	6,5	40,2
	19.05.2015	20	-	-	-	10	4	-	12	-	5,9	35,9
KL	03.12.2014	27	-	-	-	14	-	-	-	-	-	-
KA-F1	03.07.2013	durchschnittlich ca. 570 m ³ FM/d eingedickter kommunaler Abwasserschlämm									-	-
	04.06.2014										-	-
KA-F2	03.07.2013										-	-

Die zur Fütterung verwendeten Substrate sind: MS: Maissilage; HTK: Hühnertrockenkot; RM: Rindermist; GR: Grünroggen-Ganzpflanzensilage; RG: Rindergülle; PM: Pferdemit; SG: Schweinegülle; GS: Grassilage und WK: Weizenkörner. FM: Frischmasse; OLR: Raumbelastung („organic loading rate“); HRT: hydraulische Verweilzeit („hydraulic retention time“)

Die einzelnen Proben wurden vom jeweiligen Biogasanlagenbetreiber (Anlagen A, B und C: Bioreact/Bonalytic Troisdorf; Anlage KL: DREWAG, Dresden; Anlage KA: Stadtentwässerung, Dresden) nach der DIN EN ISO/IEC 17025 entnommen und bei 4 °C in dichten Kunststoffgefäßen transportiert.

Die Proben der Anlagen A, B und C wurden im N₂-Anaerobenzelt (Coy Laboratory Products, Grass Lake, USA) in einer N₂/H₂-Atmosphäre (96 %/4 % [v/v]) in Müller-Krempel-Flaschen (Glasgerätebau Ochs, Bovenden, DEU) aliquotiert, 3-5 min mit N₂/CO₂ (80 %:20 % [v/v]) durchgast, ü. N. bei 4 °C gelagert und am folgenden Tag weiter verarbeitet. Die Proben der Anlagen KL und KA wurden direkt nach ihrer Ankunft verwendet.

2.1.2 *Kontinuierliche Hemmversuche im 9 l Maßstab*

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Versuche zur Hemmung des Reaktorbetriebes im Labormaßstab wurden durch die Firma Bioreact/Bonalytic durchgeführt und betreut. Der Probenversand erfolgte wie unter 2.1.1 beschrieben.

2.1.2.1 Allgemeine Durchführung

Zur Simulation der Reaktorbedingungen in Anlage A wurden volldurchmischte, doppelwandige Acrylglas-Reaktoren (Brutto-Faulvolumen: 9 l, Bioreact/Bonalytic, Troisdorf, DEU) verwendet, die auf 39 °C temperiert wurden. Die Reaktoren wurden zunächst mit 4 l Biogasschlamm aus Anlage A und 4 l Wasser gefüllt und anschließend täglich mit Maissilage vermischt mit mikrobiell aktivem Fermenterzentrat (flüssige Phase nach Feststoffseparation des Fermenterinhalt) beschickt und dabei eine Grundlast von 1,25 g oTS/l*d (Ammonium-Intoxikation I und Versauerung I) bzw. 3 g oTS/l*d (Ammonium-Intoxikation II und Versauerung II) eingestellt. Die Vermischung in den Versuchsreaktoren erfolgte mit Hilfe eines Kreuzbalkenrührers (Rührwerke: RW 20, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DEU und RZR 2051 Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, DEU, Rührwerkssteuerung: Conrad Electronic, Berlin, DEU) durch 15 minütiges Rühren mit anschließender Pause (60 min) sowie jeweils unmittelbar vor und nach der Fütterung.

2.1.2.2 Ammonium-Toxizitäts-Versuche

Um die Auswirkungen einer Ammoniak-Intoxikation auf die mikrobielle Biozönose im Biogasschlamm zu analysieren, wurde eine Ammonium-Akkumulation durch Zugabe von Harnstoff simuliert. Dabei sollte die Veränderung der Mikroorganismenzusammensetzung in vier Schritten erfasst werden: 1. vor Harnstoffgabe (Kontrolle), 2. bei leichter Hemmung, 3. bei schwerer Hemmung und 4. im erholten Zustand nach einer leichten Hemmung (Tabelle 4). Die leichte Hemmung wurde dabei durch einmalige Zugabe von 16 g Ammoniakwasser (25 % v/v) und im Anschluss, nach sechs tägiger Pause, von 29 g/d Harnstoff an zwei und nach einer weiteren zehntägigen Pause erneut 29 g/d Harnstoff an drei aufeinander folgenden Tagen induziert. Dabei wurde eine Endkonzentration

von ca. 10 g/l Ammonium-Stickstoff ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) erreicht. Ein zweiter Fermenter wurde nach gleichen Harnstoffzugaben weitere zwei Monate ohne zusätzlichen Harnstoff inkubiert, um eine Erholung zu ermöglichen. Da jedoch die $\text{NH}_4^+\text{-N}$ -Konzentration nicht abnahm, wurde dieser Versuch abgebrochen. Der Reaktor, in dem eine schwere Hemmung simuliert werden sollte, wurde zunächst parallel zum Reaktor der leichten Hemmung behandelt, allerdings wurde die dritte Harnstoffgabe auf sechs Tage verlängert (vier Tage 29 g/d und zwei Tage 45 g/d). Zusätzlich wurde mit ein-, zwei- und dreitägiger Pause ein weiterer Harnstoffpuls (je 29 g/d) zugeführt, sodass eine $\text{NH}_4^+\text{-N}$ -Konzentration von ca. 17 g/l erreicht wurde.

In einem zweiten Ammonium-Toxizitäts-Versuch wurde die mikrobielle Biozönose unter geringerer Ammonium-Belastung untersucht. Dazu wurden zwei Reaktoren (leichte Hemmung und leichte Hemmung mit Erholung) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen zusätzlich zur Grundlast mit 28,6 g/d Harnstoff beschickt und nach eintägiger Pause noch fünf weitere Harnstoffpulse von 1,79 g/d zugegeben, sodass eine Endkonzentration von 4-5 g/l $\text{NH}_4^+\text{-N}$ in den Proben erreicht wurde. Zur Erholung wurde ein Reaktor noch einen Monat bis zur Normalisierung der $\text{NH}_4^+\text{-N}$ -Konzentration ohne Harnstoffzugabe inkubiert. Die schwere Hemmung wurde durch sechs Harnstoffpulse ausgelöst: 3x 28,6 g/d und 1x 5,38 g/d und nach eintägiger Pause erneut 2x 28,6 g/d. Dabei wurde eine $\text{NH}_4^+\text{-N}$ -Konzentration von 8 g/l erreicht. Zusätzlich wurde zu jedem Reaktor eine Kontrolle mitgeführt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Probenübersicht der Ammonium-Toxizitäts-Versuche.

Versuch	Probenbezeichnung	Probenahme	Zusatzinformationen
Ammonium-Intoxikation I	Kontrolle	16.07.2014	Das Fermentermaterial aus Anlage A wurde im Mai 2014 entnommen
	leichte Hemmung	16.07.2014	
	schwere Hemmung	28.7.2014	
	„Erholung“	15.09.2014	
Ammonium-Intoxikation II	Kontrolle I	17.02.2015	Das Fermentermaterial aus Anlage A wurde im Januar 2015 entnommen
	leichte Hemmung		
	Kontrolle II	25.02.2015	
	schwere Hemmung		
	Kontrolle III	10.03.2015	
	Erholung		

2.1.2.3 Versauerungsversuche

Da im industriellen Betrieb von Biogasanlagen eine Akkumulation von Säuren in der Regel durch zu hohe Substratzufuhr entsteht, sollte in einem ersten Versuch die Versauerung durch Zugabe von Glucose simuliert werden. Dazu wurden zwei parallele Fermenter zusätzlich zur Grundlast stoßweise mit Glucose beschickt (8 g/d). Nach beginnender Säureanreicherung wurde ein Fermenter

geöffnet, um die mikrobielle Biozönose zu untersuchen. Ein zweiter Fermenter wurde darüber hinaus bis zur Normalisierung der Säurekonzentration lediglich mit der oben genannten Grundlast weiter beschickt und im Anschluss untersucht. Als Kontrolle dienten jeweils Fermenter, bei denen keine Glucose-Beschickung vorgenommen wurde (Tabelle 5).

In einem zweiten Versuch sollte die Versauerung durch zusätzliche Fütterung von „*corn cob mix*“ (CCM), einem sehr stärkehaltigen und leicht vergärbaren Substrat, erfolgen. Dazu wurden die Reaktoren zusätzlich mit 3 g oTS/m³ CCM beschickt. Dadurch kam es allerdings bereits nach einer Woche zu starker Schaumbildung und keiner ausreichenden Säureakkumulation, sodass im Folgenden die Ansäuerung durch tägliche Zugabe von Speiseöl erreicht werden sollte. Dafür wurde die Zugabe von Speiseöl schrittweise von zusätzlichen 1 g oTS/m³ auf 5 g oTS/m³ gesteigert. Untersucht wurden, wie auch im ersten Versauerungsversuch, je eine Probe nach Säureanreicherung sowie eine Probe nach Normalisierung mit jeweiligen Kontrollen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Probenübersicht der Versauerungsversuche.

Versuch	Probenbezeichnung	Probenahme	Zusatzinformationen
Versauerung I	Kontrolle I	03.12.2014	Das Fermentermaterial aus Anlage A wurde im November 2014 entnommen
	Versauerung		
	Kontrolle II	10.12.2014	
	Erholung		
Versauerung II	Kontrolle I	19.04.2015	Das Fermentermaterial aus Anlage A wurde im Januar 2015 entnommen
	Versauerung		
	Kontrolle II	27.04.2015	
	Erholung		

2.2 Bestimmung chemischer Parameter

Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten chemischen Parameter wurden durch Bioreact/Bonalytic (Troisdorf, DEU) bzw. Herrn Heiko Herrling (Sächsische Akademie der Wissenschaften, Leipzig, DEU) bestimmt und zur Verfügung gestellt. Die dafür verwendete Methodik ist in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Zur Bestimmung der chemischen Parameter verwendete Methoden.

Parameter	Durchführung
Trockenmasse bzw. Wassergehalt	DIN 38414-S2 ²
Organische Trockesubstanz (oTS)	DIN EN 12879:2000 ¹
Ammonium-Stickstoff ($\text{NH}_4^+\text{-N}$)	elektrometrische Methode mit gassensitiver Ammoniak elektrode nach VDLUFA- Methodenbuch II (120) ¹
Essigsäure Propionsäure	gaschromatographische Bestimmung ¹
Flüchtige organische Säuren (FOS) gesamter anorganischer Kohlenstoff (TAC)	potentiometrische Titration ¹
pH-Wert	DIN EN 12176 ¹
Acetat (CO_3COO^-) Sulfat-Schwefel ($\text{SO}_4\text{-S}$)	DIN EN ISO 10304-21 unter Verwendung des Ionenchromatographen ICS 3000 mit Trennsäule Dionex™ IonPac™ AS9-HC (Dionex Corporation, Sunnyvale, USA) ²
Gelöstes Eisen (D-Fe)	DIN EN 38406 unter Verwendung der Atomabsorptions-spektrometrie (Varian Spectra 220 FS, Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Böblingen, DEU) ²

¹Durchführung durch Biorect/Bonalytic²Durchführung durch Herrn Heiko Herrling

2.3 DNA-basierte Analytik

2.3.1 Isolation von gesamt DNA und Konzentrationsbestimmung

Da bisher keine spezifisch optimierte Methodik für die DNA-Isolation aus Material von Biogasanlagen zu Verfügung stand, wurden zunächst fünf verschiedene kommerziell erhältliche Kitsysteme nach Herstellerangaben getestet (Tabelle 7). Die Elution der DNA erfolgte jeweils in 50 µl des vorgesehenen Elutionspuffers. Nachdem alle Kitsysteme hinsichtlich ihrer Eignung für das gegebene Probenmaterial evaluiert wurden (siehe 3.1.1), wurde die DNA im Folgenden aus 0,05 g Probenmaterial mit MN isoliert. Die Konzentration der isolierten DNA wurde zum einen spektrophotometrisch bei 260 nm mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 (Peglab Biotechnologie, Erlangen, DEU) bestimmt. Der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm (260/280) wurde als Maß für die Reinheit der DNA betrachtet. Zum anderen erfolgte die DNA-Konzentrationsbestimmung gelelektrophoretisch (siehe 2.3.3).

Tabelle 7: Getestete kommerzielle DNA-Isolations-Kits.

Kit Bezeichnung (Abkürzung)	Hersteller	Empfohlenes Probenmaterial	Besonderheiten
Ultra Clean® Soil DNA Isolation Kit (UC)	MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, USA	Bodenproben	-
Power Soil™ DNA Isolation Kit (PS)	MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, USA	Bodenproben	-
Nucleo Spin® Soil Kit (MN)	Machery&Nagel, Düren, DEU	Bodenproben	-
QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qia)	Qiagen, Venlo, NLD	humane Stuhlproben	Nach Zugabe von 300 µl ddH ₂ O zu ca. 1 g Probenmaterial wurde die Probe 5 min bei 99 °C inkubiert, 5 min bei 3500 x g pelletiert und 200 ml des Überstandes zur DNA-Isolation verwendet.
GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Jet)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, DEU	Bakterien- suspension	Nach Zugabe von 300 µl ddH ₂ O zu ca. 1 g Probenmaterial wurde die Probe 5 min bei 99 °C inkubiert, 5 min bei 3500 x g pelletiert und der gesamt Überstande zur DNA-Isolation verwendet. Das Protokoll für gram- negative Bakterien wurde durchgeführt.

2.3.2 Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente, die für DGGE, Klonierungen und Sequenzierungen benötigt wurden, wurde eine konventionelle PCR durchgeführt. Die dabei verwendeten *Primer* sind der Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Verwendete *Primer*, deren 5'-3'-Sequenz, Spezifität und Verwendung.

Primer- Bezeichnung	5'-3'-Sequenz	Spezifität/ Verwendung	Referenz
Ar9r	CCC GCC AAT TCC TTT AAG TTT C		(121)
A349f	GYG CAS CAG KCG MGA AW		(122)
A349f_GC	<u>CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC</u> <u>GGC CCG CCG CCC CCG CCC CGY</u> GCA SCA GKC GMG AAW		(122)
Arc787f_GC	<u>CGC CCG CCG CCG CCC GCG CCC</u> <u>GCC CCG CCC GCC CCG CCC CGA</u> TTA GAT ACC CSB GTA GTC C	Archaea/ Etablierung DGGE	(123)
Ar806r	GGA CTA CVS GGG TAT CTA AT		(122)
SAf_GC	<u>CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC</u> <u>GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC</u> TAY GGG GCG CAG CAG G		verändert nach (124)
SAr	CCT GCT GCG CCC CRT AGG		
Arc1059r	GCCATGCACCWCCTCT		(123)
A109f	ACK GCT CAG TAA CAC GT	Archaea/	(125)
A915r	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	erste PCR	(126)
Parch340f	CCC TAC GGG GYG CAS CAG		(127)
Parch519r	CAG CCG CCG CGG TAA		
A915r_GC	<u>CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC</u> <u>GGC CCG CCG CCC CCG CCC CGT</u> GCT CCC CCG CCA ATT CCT	Archaea/ DGGE-PCR	verändert nach (126)
Mbt857f	CG WAG GGA AGC TGT TAA GT	Methanobacteriales/ PCR	(123)
Mbt857f_GC	<u>CGC GCG CCG CGC GCG GCG GGC</u> <u>GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCG</u> WAG GGA AGC TGT TAA GT	Methanobacteriales/ DGGE-PCR	verändert nach (123)
Mbt1196r	TACCGTCGTCCACTCCTT		(123)
Mcc495f	TAA GGG CTG GGC AAG T	Methanococcales/	(123)
Mcc832r	CAC CTA GTY CGC ARA GTT TA	PCR	

Die aufgeführten *Primer* binden jeweils Bereiche der 16S rDNA und wurden von Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, DEU bezogen. Die unterstrichene Sequenz markiert jeweils die für die DGGE angefügte GC-Klammer. Verwendete degenerierte Basenbezeichnungen: Y: C oder T; S: C oder G; K: G oder T; M: A oder C; W: A oder T; V: A, C oder G; R: A oder G.

Die PCR-Reaktionen wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen (PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0,2 ml, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DEU) durchgeführt und setzten sich aus folgenden Komponenten zusammen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Komponenten eines PCR-Ansatzes mit der goTaq® DNA Polymerase.

Komponente	Eingesetzte Konzentration
5x Green goTaq® Puffer	1x (enthält 1,5 mM MgCl ₂)
dNTP-Mix; 1 mM je dNTP	0,1 mM je dNTP
Primer vorwärts; 10 pmol	0,2 pmol/μl
Primer revers; 10 pmol	0,2 pmol/μl
goTaq® DNA Polymerase; 5 U/μl	1,25 U/20 μl
Template; 1:50	2μl/20 μl
DEPC behandeltes Wasser	ad. 20 μl

Die goTaq® DNA Polymerase mit zugehörigem Puffer sowie der dNTP-Mix wurden von Promega, Mannheim, DEU und das DEPC behandelte Wasser von der Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU bezogen.

Für die Reamplifikation von DNA aus DGGE-Signalen mit dem *Primer*-Paar Arc376f/Arc691r wurde die Perpetual *Taq* DNA Polymerase (Roboklon, Berlin, DEU) mit den folgenden Komponenten verwendet (Tabelle 10).

Tabelle 10: Komponenten eines PCR-Ansatzes mit der Perpetual *Taq* DNA Polymerase.

Komponente	Eingesetzte Konzentration
10x Puffer B	1x (enthält 1,5 mM MgCl ₂)
dNTP-Mix; 1 mM je dNTP	0,2 mM je dNTP
Primer vorwärts; 10 pmol	0,2 pmol/μl
Primer revers; 10 pmol	0,2 pmol/μl
Perpetual <i>Taq</i> DNA Polymerase; 2,5 U/μl	1,25 U/20 μl
Template; 1:50	2 μl/20 μl
DEPC behandeltes Wasser	ad. 20 μl

Das DEPC behandelte Wasser wurde von der Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU bezogen.

Die Amplifikation erfolgte anschließend im T3- bzw. Tpersonal-Thermocycler (Biometra, Göttingen, DEU) unter folgenden Bedingungen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Verwendete PCR-Programme.

Spezifität; <i>Primer</i> -Paar	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Reaktionszeit [min:s]	Zyklenzahl
<i>Archaea</i> ; A109f/A934r	initiale Denaturierung	94	3:00	15
	Denaturierung	94	1:00	
	Anlagerung	62 (-0,5 p. Z.)*	1:00	
	Elongation	72	2:00	
	Denaturierung	94	1:00	10
	Anlagerung	52	1:00	
	Elongation	72	2:00	
	finale Elongation	72	5:00	

Tabelle 11 (Fortsetzung): Verwendete PCR-Programme.

Spezifität; Primer-Paar	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Reaktionszeit [min:s]	Zyklenzahl
<i>Archaea</i> ; Parch340f/A915r_GC und Arc376f/Arc691r	initiale Denaturierung	95	5:00	20
	Denaturierung	95	1:00	
	Anlagerung	50	1:00	
	Elongation	72	1:00	
	finale Elongation	72	10:00	
<i>Archaea</i> ; Parch519f/A915r_GC	initiale Denaturierung	95	5:00	20
	Denaturierung	95	0:30	
	Anlagerung	57	0:40	
	Elongation	72	0:40	
	finale Elongation	72	10:00	
<i>Methanobacteriales</i> ; Mbt857f_GC/Mbt1196r und Mbt857/Mbt1196r	initiale Denaturierung	94	5:00	20
	Denaturierung	94	1:15	
	Anlagerung	57 (-0,5 p. Z.)*	1:15	
	Elongation	72	1:15	
	Denaturierung	94	1:15	30
	Anlagerung	47	1:15	
	Elongation	72	1:15	
	finale Elongation	72	10:00	

*Touchdown-PCR mit Verringerung der Anlagerungstemperatur um 0,5 °C pro Zyklus (p. Z.)

2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Um den Erfolg der PCR-Amplifikation zu überprüfen und die Konzentration der entstandenen Produkte abzuschätzen wurden die generierten DNA-Fragmente nach ihrer Größe im 1 %igen [w/v] (isolierte DNA und *Archaea*-Fragmente) bzw. 2 %igen [w/v] (*Methanobacteriales*-Fragmente) Agarosegel aufgetrennt. Dazu wurde die Agarose (SeaKem Agarose, Lonza, Rockland, USA) in 1xTAE-Puffer (Tabelle 12) durch Erhitzen auf ca. 100 °C gelöst und mit Hilfe des Gelsystems Flachgel-Elektrophoresekammer (von Keutz Labortechnik, Reiskirchen, DEU) gegossen. Die DNA-Lösung wurde im Anschluss zusammen mit dem quantitativen Größenstandard 10 kb Smart Ladder (Eurogentec, Seraing, BEL) für 1 %ige [w/v] Gele bzw. 1 kb Smart Ladder SF (Eurogentec, Seraing, BEL) für 2 %ige [w/v] Gele bei konstanter Spannung von 140 V 35 min (Consort E844, von Keutz Labortechnik, Reiskirchen, DEU) elektrophoretisch in 1x TAE-Puffer aufgetrennt. Das Hinzufügen eines Ladepuffers war bei PCR-Produkten nicht nötig, da dieser bereits im Polymerasenpuffer enthalten war. Der isolierten DNA wurde der Ladepuffer Roti-Load DNA (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU) zugefügt. Zur Visualisierung der DNA wurden die Agarose-Gele ca. 10 min in einer 0,001 %igen [v/v] Ethidiumbromid-Lösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU) gefärbt und im Anschluss mit Hilfe eines

UV-Transilluminators (Universal hood 75S, BioRad, München, DEU) visualisiert und mit der Software *Quantity One* 4.1.1 (BioRad, München, DEU) ausgewertet.

Tabelle 12: Zusammensetzung des 50x TAE-Puffers.

Substanz	Hersteller	Konzentration
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU	2 M
Essigsäure, 100 %	Merck, Darmstadt, DEU	5,17 % [v/v]
EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU	0,1 M

2.3.4 Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)

Zur Auftrennung von PCR-Fragmenten gleicher Länge aber unterschiedlicher Sequenz aus komplexen Proben wurde die DGGE durchgeführt. Durch in Laufrichtung zunehmende denaturierende Bedingungen wird dabei doppelsträngige DNA anhand des sequenzspezifischen Schmelzverhaltens (bzw. der Ausbildung von Schmelzdomänen) partiell denaturiert und durch so entstehende unterschiedliche Migrationseigenschaften elektrophoretisch aufgetrennt (128). Ein vollständiges Denaturieren der DNA-Fragmente wird durch eine bei der PCR angefügte GC-reiche Sequenz (GC-Klammer) verhindert. Dadurch kann die Detektion insbesondere von Einzelbasenunterschieden verbessert werden (129).

Vorbereitend wurden mit Hilfe der *Primer*-Paare Parch340f/Arc915r_GC und Parch519f/Arc915r_GC (*Archaea*) bzw. Mbt857f_GC/Mbt1196r (*Methanobacteriales*) (Tabelle 8) durch PCR (2.3.2) die in der DGGE aufzutrennenden Fragmente generiert und dabei eine GC-Klammer angefügt. Um die Spezifität der *Archaea*-PCR zu erhöhen und gleichzeitig die Amplikonlänge für die DGGE zu optimieren, wurde zunächst ein längerer Bereich der archaeellen 16s rDNA amplifiziert (109f/934br) und im Anschluss mittels „*nested*-PCR“ die oben genannten DNA-Fragmente für die DGGE erzeugt (130). Die Konzentrationsbestimmung der entstandenen PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (0) durch Vergleich der Signalintensität mit dem Größenstandard.

Für die Durchführung der DGGE wurde das System INGENYphorU-2-Gele (Ingeny International BV, Goes, NLD) verwendet. Dafür wurde zunächst die Gelkuvette nach Herstellerangaben aufgebaut. Die anschließende Herstellung der Gellösungen erfolgte aus sterilfiltrierten (Whatman RC58 Membrane Circles, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, DEU) und bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagerten Stammlösungen (Tabelle 13). Die sequenzspezifische Auftrennung der DNA erfolgte mit Hilfe eines Doppelgradienten aus 7-8 % [v/v] Acrylamid, sowie 35-65 % (*Archaea* mit Parch519f/Arc915r_GC) bzw. 40-70 % (*Archaea* Parch340f/Arc915r_GC und *Methanobacteriales*) denaturierenden Agenzien (Harnstoff und Formamid). Dabei wurde das diskontinuierliche Prinzip

angewendet (131). Dazu wurden zunächst die Trenngellösungen hergestellt (Tabelle 14) und mit Hilfe des Gradientenmischers (Gradient Former Model 485, BioRad, München, DEU) und einer Peristaltikpumpe (IP55, Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen, DEU) in die Gelküvette gegossen. Die stetige Durchmischung der Gellösungen erfolgte dabei mittels Magnetrührer (RET basic, IKA Labortechnik, Staufen, DEU). Nach abgeschlossener Polymerisation wurde überschüssiges Wasser abgenommen und das Sammelgel (Tabelle 14) mit Hilfe einer Spritze zwischen den Kamm auf das Trenngel gegossen.

Tabelle 13: Zusammensetzung der Stammlösungen für DGGE-Gele.

Substanz	7 % Acrylamid		8 % Acrylamid	
	0% denaturierend	80 % denaturierend	0% denaturierend	80 % denaturierend
Harnstoff	-	168 g	-	168 g
Formamid	-	160 ml	-	160 ml
50x TAE, pH 7,4 (mit HCl)	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Rotiphorese Gel 40	87,5 ml	87,5 ml	100 ml	100 ml
Aqua dest.	ad. 500 ml	ad. 500 ml	ad. 500 ml	ad. 500 ml

Die Chemikalien wurden jeweils von der Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU bezogen. Die Zusammensetzung des TAE-Puffers ist dem Kapitel 0 zu entnehmen.

Tabelle 14: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele.

Substanz	Lösung A (Sammelgel)	Lösung B (Trenngel)		Lösung C (Trenngel)	
	7 % Acrylamid	7 % Acrylamid		8 % Acrylamid	
	0 % denaturierend	35 % denaturierend	40 % denaturierend	65 % denaturierend	70 % denaturierend
Stammlösung 0 %	7 ml	13,5 ml	12 ml	4,5 ml	3 ml
Stammlösung 80 %	-	10,5 ml	12 ml	19,5 ml	21 ml
TEMED	7 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
APS; 20 % [w/v]	70 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

TEMED und APS wurden von der Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU bezogen.

Im Anschluss wurde der Kamm entfernt, die Gelkassette luftblasenfrei in die Pufferkammer mit 1x TAE-Puffer transferiert und der Puffer auf 60 °C erhitzt. Daraufgehend wurden ca. 80-100 ng PCR-Produkt aufgetragen und 20 h bei einer konstanten Spannung von 100 V (Electrophoresis Power Supply EPS 1001, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Wien, AUT) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Um die Vergleichbarkeit der Gele zu ermöglichen, wurde ein Standard durch Frau Dr. Burga Braun (TU Berlin) zur Verfügung gestellt, der DNA-Fragmente unterschiedlichen GC-Gehalts

der Organismen *Flexibacillus* sp., *Bacillus sphaericus*, *Commamonadaceae bacterium* MWH5, *Sphaerotilus* sp., *Enterococcus faeces*, *Variovorax paradoxus*, *Leptothrix discophora* sowie *Leptothrix mobilis*. enthält. Zusätzlich wurde der Standard durch AT-reiche DNA-Fragmente aus *Mycoplasma penetrans* ARA, *Mycoplasma salivarium* und *Mycoplasma gallisepticum* ergänzt.

Zur Auswertung der DGGE-Gele wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel 30 min mit 20 ml des DNA-interkalierenden Farbstoffes SYBR *Gold Nucleic Acid Gel Stain* (1:10.000 in 1x TAE, Invitrogen GmbH, Darmstadt, DEU) unter Lichtausschluss gefärbt. Die Visualisierung der Signale erfolgte wie unter 0 beschrieben. Zur Analyse der DGGE-Profile wurde die Software *Bionumerics v6.0* (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, BEL) verwendet. Für die Berechnung von Dendrogrammen wurde dabei ein Similaritätsindex auf Basis der Anzahl unterschiedlicher Banden berechnet und die Clustering-Methode UPGMA [„*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*“, (132)] verwendet.

2.3.5 Analyse ausgewählter DGGE-Signale

Um die Organismen, die durch prominente DGGE-Signale repräsentiert werden, phylogenetisch einordnen zu können, wurden diese unter UV-Transillumination (UV-Tisch Syngene GVM20, Synoptics Ltd., Cambridge, UK) aus dem DGGE-Gel ausgeschnitten und 2 h bei Raumtemperatur (RT) in 300 µl ddH₂O gewaschen. Anschließend wurde das Gelstück in 50 µl DEPC-behandeltes Wasser (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU) überführt und die DNA durch dreimaliges Einfrieren (-80 °C) und Auftauen (37 °C, 30 min, 500 rpm, Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg, DEU) eluiert. Zur Amplifikation der isolierten DNA-Fragmente wurde die entsprechende PCR mit *Primern* ohne GC-Klammer durchgeführt, bzw. eine PCR mit dem *Primer*-Paar Arc376f/Arc691 für schwer amplifizierbare Proben (siehe 2.3.2). Im Anschluss wurden mit Hilfe der Exonuklease I (New England BioLabs Inc., Hertfordshire, UK) und der Shrimp Alkaline Phosphatase (USB, Cleveland, USA) noch im PCR-Produkt enthaltene *Primer* und dNTPs abgebaut. Dazu wurden 5 µl Amplifikat mit 2 µl einer Gebrauchslösung (jeweils 1 U/µl beider Enzyme) versetzt und bei 37 °C für 30 min und 15 min bei 80 °C im T3-Thermocycler (Biometra, Göttingen, DEU) inkubiert. Die Sequenzierreaktion wurde mittels BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) im 10 µl Maßstab durchgeführt, indem das gereinigte PCR-Produkt mit 1x *BigDye Sequencing Buffer* und 1 pmol des entsprechenden *Primers* versetzt und unter folgenden Bedingungen (Tabelle 15) inkubiert wurde.

Tabelle 15: Reaktionsbedingungen einer Sequenzier-PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Reaktionszeit [min:s]	Zyklenzahl
Denaturierung	96 °C	0:10	25
Anlagerung	*	0:05	
Elongation	60 °C	4:00	

*Anlagerungstemperatur des jeweiligen *Primers* (siehe Tabelle 11)

Nach Aufreinigung des Sequenzieransatzes unter Verwendung des MSB Spin PCRapace Kit (Invitek, Berlin, DEU) nach Herstellerangaben erfolgte die Sequenzierung mittels Kettenabbruchmethode durch Herrn Dr. Wolfram Rudolph im Abi Prism™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA). Die resultierenden Sequenzen wurden zunächst mit Hilfe der Software BioEdit Sequence Alignment Editor v7.1.11 (133) kontrolliert und gegebenenfalls editiert und im Anschluss mit Hilfe der Datenbank „*ribosomal database project*“ (RDP, Stand 11/2015, (134)) taxonomisch eingeordnet. Der phylogenetisch am nächsten verwandte Organismus wurde mit Hilfe des BLAST-Tools von NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Stand 11/2015, (135)) ermittelt. Da häufig sehr viele nahe verwandte Organismen zu finden waren, wurden zunächst nur Organismen einbezogen, deren gesamte Genom-Sequenz bekannt ist (Datenbank: „*NCBI Genomes*“). Wenn dabei kein Organismus mit einer Sequenzidentität von $\geq 97\%$ identifiziert werden konnte, wurde die Datenbank „*Reference RNA Sequences (refseq_rna)*“ verwendet. Um auch dann noch nicht-klassifizierbare Sequenzen einordnen zu können, wurden diese mit Sequenzen bisher nicht kultivierter Organismen verglichen (Datenbank: „*Nucleotide Collection*“).

2.3.6 Klonierung und Sequenzanalyse

Mit Hilfe der Erstellung spezifischer *Archaea*- und *Methanobacteriales*-Klonbanken aus Biogasproben sollte die Diversität der Methanogenen erfasst und zusätzlich prominente Signale der charakteristischen DGGE-Profile phylogenetisch eingeordnet werden. Dazu wurden zunächst spezifische 16S rDNA-Fragmente mit den *Primer*-Paaren A109f/A934r (*Archaea*) und Mbt857/Mbt1196r (*Methanobacteriales*) (siehe Tabelle 8) amplifiziert (siehe 2.3.2) und mit Hilfe des MSB Spin PCRapace Kits (Invitek, Berlin, DEU) aufgereinigt. Zur Klonierung wurde die chemische Transformation des TOPO TA Cloning® Kits (Invitrogen, Carlsbad, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die transformierten Zellen wurden ü. N. auf LB-Festmedium (Difco™ LB-Agar, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU) zur Selektion und 133 µg/ml X-Gal (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU) sowie 4,5 µg/ml IPTG (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU) zur Blau-Weiß-Selektion bei 37 °C inkubiert und am folgenden Tag wurde die korrekte Insertion der DNA-Fragmente in den pCR®4-TOPO Vektor durch *Colony*-PCR

(siehe 2.3.2) überprüft. Um Klone zu identifizieren, die wichtige DGGE-Signale repräsentieren, wurde das klonierte Fragment einzelner zufällig gewählter Kolonien mit den jeweiligen DGGE-*Primern* (siehe Tabelle 8) amplifiziert (siehe 2.3.2) und mittels DGGE (siehe 2.3.4) entsprechende Klone ausgewählt. Deren klonierte Sequenz wurde im Anschluss zunächst mit den oben genannten *Primern* amplifiziert, mit Hilfe des MSB Spin PCRapace Kit (Invitex, Berlin, DEU) nach Herstellerangaben gereinigt und durch die Firma SeqLab Sequence Laboratories GmbH (Göttingen, DEU) sequenziert. Die Auswertung der resultierenden Sequenzen erfolgte wie unter Abschnitt 2.3.5 beschrieben. Zur Darstellung der systematischen Einordnung untersuchter Klone wurden mit Hilfe der Software MEGA 5 beta (136) phylogenetische Stammbäume mit je 250 *bootstrap*-Wiederholungen (137) berechnet. Dabei wurde die *Maximum Likelihood*-Methode basierend auf dem Jukes-Cantor-Model (138) verwendet. Die Vergleichssequenzen nahe verwandter, bekannter Organismen wurden der Datenbank „NCBI Nucleotide“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) entnommen.

2.3.7 Quantitative PCR (qPCR)

Zur Quantifizierung der absoluten Zellzahl von Bacteria, Archaea sowie der archaeellen Genera *Methanoculleus* und *Methanosarcina* im Biogasschlamm kam die qPCR zum Einsatz. Die dafür verwendeten *Primer* sind der Tabelle 16 zu entnehmen.

Tabelle 16: Für die qPCR verwendete *Primer*, deren Sequenz und Spezifität.

Primer- Bezeichnung	5'-3'-Sequenz	Spezifität	Referenz
Bac341f	CCTACGGGAGGCAGCAG	<i>Bacteria</i>	(102)
Bac907r	CCGTCAATTCMTTGTAGTTT		(139)
Arc787f	ATTAGATACCCSBGTAGTCC	<i>Archaea</i>	(123)
Arc1059r	GCCATGCACWCCTCT		
Arc915f*	AGGAATTGGCGGGGAGCAC		
Mcu298f	GGAGCAAGAGCCCGGAGT	<i>Methanoculleus</i>	(140)
Mcu586r	ATTCCCAAGAGACTTAACAACCCA		
MB1b	CGGTTTGGTCAGTCCTCCGG	<i>Methanosarcina</i>	(141)
SAR835r	AGACACGGTCGCGCCATGCCT		

Die aufgeführten *Primer* binden jeweils Bereiche der 16S rDNA und wurden von Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, DEU bezogen. **TaqMan*-Sonde mit 3'-seitigem Quencher (TAMRA) und 5'-seitiger FAM-Markierung. Verwendete degenerierte Basenbezeichnungen: M: A oder C; S: C oder G; B: C,G oder T;W: A oder T.

Die *Bacteria*-qPCR für die Evaluierung einer geeigneten Methode zur Isolation von DNA aus Biogasschlamm wurde mit Hilfe der goTaq DNA Polymerase (Promega, Mannheim, DEU) durchgeführt, deren Komponenten in Tabelle 17 aufgeführt sind.

Im Folgenden wurde für die *Bacteria*-qPCR ebenso wie für die spezifischen qPCRs für *Methanoculleus* und *Methanosarcina* der GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Mannheim, DEU) verwendet, deren Komponenten Tabelle 18 zu entnehmen sind.

Die Quantifizierung von *Archaea* erfolgte unter Zuhilfenahme des Absolut Blue qPCR Mix (Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, DEU). Die Zusammensetzung der Reaktionskomponenten ist in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 17: Zusammensetzung einer qPCR-Reaktion unter Verwendung der goTaq DNA Polymerase.

Komponente	Eingesetzte Konzentration
5x Colorless goTaq® Puffer	1x (enthält 1,5 mM MgCl ₂)
dNTP-Mix; 1 mM je dNTP	0,2 mM je dNTP
EvaGreen™; 10x	1x
Primer vorwärts; 10 pmol	0,25 pmol/μl
Primer revers; 10 pmol	0,25 pmol/μl
goTaq® DNA Polymerase; 5 U/μl	0,5 U/20 μl
Template; 1:50	2 μl/20 μl
DEPC behandeltes Wasser	ad. 20 μl

Das EvaGreen sowie das DEPC behandelte Wasser wurden von der Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU bezogen.

Tabelle 18: Komponenten einer qPCR mit dem GoTaq qPCR Master Mix.

Komponente	Eingesetzte Konzentration
2x GoTaq®qPCR Master Mix	1x (enthält 1,5 mM MgCl ₂)
CXR; 30 μM	0,3 μM
Primer vorwärts; 10 pmol	0,25 pmol/μl
Primer revers; 10 pmol	0,25 pmol/μl
Template; 1:50	2 μl/20 μl
DEPC behandeltes Wasser	ad. 20 μl

Das DEPC behandelte Wasser wurde von der Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU bezogen.

Tabelle 19: Reaktionskomponenten einer *Archaea*-spezifischen qPCR.

Komponente	Eingesetzte Konzentration
2x Absolute™ Blue qPCR Mix	1x
ROX; 30 μM	1 μM
TaqMan-Sonde	0,1 pmol/μl
Primer vorwärts; 10 pmol	0,2 pmol/μl
Primer revers; 10 pmol	0,2 pmol/μl
Template; 1:50	4 μl/20 μl
DEPC behandeltes Wasser	ad. 20 μl

Das DEPC behandelte Wasser wurde von der Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU bezogen.

Die qPCR-Reaktionen wurden im Anschluss im Thermocycler (Tabelle 20) unter folgenden Bedingungen in drei bis fünf Replikaten durchgeführt (Tabelle 21).

Tabelle 20: Verwendete qPCR-Thermocycler mit zugehöriger Software und den verwendeten Reaktionsgefäßen.

Thermocycler	Software	Reaktionsgefäße	Nutzung
Mastercycler 28 ep realplex ² S (Eppendorf, Hamburg, DEU)	Realplex 2.0 (Eppendorf, Hamburg, DEU)	ABgene Easy Strip Snap Tubes Ultra Clear Caps (Thermo Fisher Scientific Abgene House, Epsom, UK)	Evaluierung der DNA- Isolationsmethodik
StepOnePlus Real- Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA)	StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems, Foster City, USA)	MicroAmp Fast Reaction Tubes (8 Tubes/Strip) mit Optical 8-Cap Strip (Applied Biosystems, Foster City, USA)	Monitoring der untersuchten Biogasanlagen

Tabelle 21: Verwendete qPCR-Programme.

Spezifität	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Reaktionszeit [min:s]	Zyklenzahl
<i>Bacteria</i> und <i>Methanosarcina</i>	initiale Denaturierung	95	5:00	40
	Denaturierung	95	0:30	
	Anlagerung	57	0:40	
	Elongation	72	0:40	
	Schmelzkurve	95	0:15	
		55-95 °C (+0,5 p. Z.)	0:15	
<i>Methanoculleus</i>	initiale Denaturierung	95	5:00	40
	Denaturierung	95	0:30	
	Anlagerung	60	0:40	
	Elongation	72	0:40	
	Schmelzkurve	95	0:15	
		55-95 °C (+0,5 p. Z.)	0:15	
<i>Archaea</i>	initiale Denaturierung	95	15:00	40
	Denaturierung	95	0:15	
	Anlagerung und Elongation	50	1:00	

Mit Hilfe der in Tabelle 20 aufgeführten Software wurden in den Reaktionen die Ct-Werte („cycle threshold“, die Zykluszahl, bei der das Fluoreszenzsignal der Probe das Hintergrundsignal überschreitet) ermittelt. Um aus diesen Ct-Werten die absolute Abundanz der Mikroorganismen in den Proben zu berechnen, wurden jeweils vier Verdünnungsstufen eines Standardplasmides mitgeführt. Die Standardplasmide der *Bacteria*- und *Archaea*- qPCR stammten aus früheren Arbeiten (142) (143). Für die Quantifizierung von *Methanoculleus* und *Methanosarcina* wurden die Standardplasmide im Rahmen dieser Arbeit generiert. Dafür wurde zunächst von aus der Anlage A isolierten Reinkulturen (*Methanoculleus*: E02.3, *Methanosarcina*: E6F.1, jeweils zur Verfügung

gestellt von Dipl. Biol. Tobias Kern, Technische Universität Dresden) das entsprechende Fragment der 16S rDNA (*Primer* siehe Tabelle 16) amplifiziert (PCR-Bedingungen siehe Tabelle 21), mittels MSB Spin PCRapace (Invitex GmbH, Berlin, DEU) gereinigt und im Anschluss unter Verwendung des TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen, Carlsbad, USA) durch chemische Transformation in den pCR4-TOPO Vektor kloniert. Nachdem das Plasmid mit Hilfe des Hi Yield Plasmid Mini Kits (Süd-Laborbedarf, Gauting, DEU) aus *E. coli* isoliert und dessen Konzentration spektrophotometrisch bestimmt wurde (NanoDrop ND-1000, Peqlab Biotechnologie, Erlangen, DEU), konnte dessen Kopienzahl anhand folgender Formel [Formel 7] bestimmt werden:

[Formel 7]

Kopienzahl:	Anzahl Plasmidmoleküle [μl^{-1}]
C_{Plasmid} :	Konzentration der Plasmidlösung [$\text{g}/\mu\text{l}$]
N_A :	Avogadro-Konstante [$6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$]
M_{Plasmid} :	Molare Masse des Plasmids [g/mol], als Grundlage wurden 660 g/mol als durchschnittliche Molare Masse eines Basenpaares angenommen

Durch Auftragen der Ct-Werte gegen den dekadischen Logarithmus der Kopienzahl konnte eine Standardgerade generiert werden, mit deren Hilfe bei einem Bestimmtheitsmaß $> 0,95$ und unter Berücksichtigung der eingesetzten Verdünnungsstufen die 16S rDNA-Kopienzahlen in den Proben bestimmt wurden. Dabei wurden nur Replikate berücksichtigt, deren Standardabweichung unter 0,5 lag. Für die Berechnung der Zellzahlen wurden empirisch ermittelte, durchschnittliche 16S-Kopienzahlen pro Zelle von 4,07 (*Bacteria*), von 3 (*Methanosarcina*) und von 1 (*Archaea*, *Methanoculleus*) angenommen (144) (145).

2.3.8 454-Amplikonsequenzierung

Für die Untersuchung der bakteriellen sowie archaeellen Biozönose in Proben verschiedener Biogasanlagen mittels 454-Amplikonsequenzierung wurden zunächst entsprechende Bereiche der 16S rDNA unter Zuhilfenahme der folgenden *Primer* amplifiziert (Tabelle 22). Zusätzlich zur dargestellten Sequenz wurde je 5'-seitig eine *Linker*-Sequenz angefügt (CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAG für individuelle *Primer* und CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG für universal-*Primer*). Die individuellen *Primer* bestehen jeweils aus der *Linker*-Sequenz, dem MID zur eindeutigen Probenzuordnung (Tabelle 22, fett) und der Phylum-spezifischen *Primer*-Sequenz

(Tabelle 22, Referenz). Die universellen *Primer* setzten sich aus der *Linker*-Sequenz und der Phylum-spezifischen *Primer*-Sequenz zusammen.

Tabelle 22: Für die 454-Amplikonsequenzierung verwendete *Primer*, deren 5'-3'-Sequenz und Spezifität.

<i>Primer</i> -Bezeichnung	5'-3'-Sequenz	Spezifität/ Referenz
U519f_MID_25	TCG TCG CTC GCA GYM GCC RCG GKA AHA CC	<i>Archaea</i> / (146)
U519f_MID_26	ACA TAC GCG TCA GYM GCC RCG GKA AHA CC	
U519f_MID_28	ACT ACT ATG TCA GYM GCC RCG GKA AHA CC	
U519f_MID_29	ACT GTA CAG TCA GYM GCC RCG GKA AHA CC	
U519f_MID_32	AGT ACG CTA TCA GYM GCC RCG GKA AHA CC	
U519f_MID_34	CAC GCT ACG TCA GYM GCC RCG GKA AHA CC	
U519f_MID_41	TAG TGT AGA TCA GYM GCC RCG GKA AHA CC	
U519f_MID_47	TGT GAG TAG TCA GYM GCC RCG GKA AHA CC	
PrB_A915R	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	<i>Archaea</i> / (126)
E1115r_MID_1	ACG ACT ACA GGG GTT NCG NTC GTT G	<i>Bacteria</i> / (147)
E1115r_MID_2	AGA CGC ACT CGG GTT NCG NTC GTT G	
E1115r_MID_3	ATC AGA CAC GGG GTT NCG NTC GTT G	
E1115r_MID_4	CGT GTC TCT AGG GTT NCG NTC GTT G	
E1115r_MID_5	ACG CTC GAC AGG GTT NCG NTC GTT G	
E1115r_MID_6	AGC ACT GTA GGG GTT NCG NTC GTT G	
E1115r_MID_7	CTC GCG TGT CGG GTT NCG NTC GTT G	
E1115r_MID_10	CGA GAG ATA CGG GTT NCG NTC GTT G	
E1115r_MID_12	TGT ACT ACT CGG GTT NCG NTC GTT G	
E1115r_MID_20	TCT ATA CTA TGG GTT NCG NTC GTT G	
E1115r_MID_21	ACA GTA TAT AGG GTT NCG NTC GTT G	
PrB_U529F	GCCAGCMGCCGCGGT	<i>Bacteria</i> / (148)

Alle Oligonukleotide wurden in NGS-Qualität von der Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, DEU bezogen. Verwendete degenerierte Basenbezeichnungen: Y: C oder T; M: A oder C; R: A oder G; K: G oder T; H: A, C oder T; N: A, C, G oder T; M: A oder C. Fett: MID-Sequenz.

Die Amplifikation wurde, wie in 2.3.2 beschrieben, mit der Perpetual *Taq* DNA Polymerase durchgeführt. Die Reaktionskomponenten sind dort der Tabelle 10 zu entnehmen. Die Reaktionsbedingungen der PCR sind in Tabelle 23 beschrieben. Im Anschluss wurden aus jeder Biogasprobe 2-3 individuelle Reaktionsansätze zusammengeführt und mit Hilfe des MSB Spin PCRapace (Invitex GmbH, Berlin, DEU) nach Herstellerangaben aufgereinigt und in DEPC behandeltem Wasser (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU) eluiert. Nach Konzentrationsbestimmung der einzelnen PCR-Produkte (NanoDrop ND-1000, Peqlab Biotechnologie, Erlangen, DEU) wurden diese äquimolar zusammengeführt und durch die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, DEU) unter Verwendung der GS FLX++ Titanium Chemie sequenziert. Die daraus resultierenden Sequenzen

wurden im Anschluss, wie von Schloss *et al.* (149) beschrieben, mit Hilfe der Software Mothur v1.36.1 bearbeitet.

Tabelle 23: PCR-Programme für die 454-Amplikonsequenzierung.

Spezifität	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Reaktionszeit [min:s]	Zyklenzahl
<i>Archaea</i>	initiale Denaturierung	95	5:00	35-40
	Denaturierung	95	0:30	
	Anlagerung	55	0:40	
	Elongation	72	1:00	
	finale Elongation	72	10:00	
<i>Bacteria</i>	initiale Denaturierung	94	10:00	24-38
	Denaturierung	94	0:30	
	Anlagerung	56	0:45	
	Elongation	72	0:45	
	finale Elongation	72	10:00	

Für die weitere Analyse wurden dabei Sequenzen mit einer Minimalen Länge von 200 bp selektiert, die keine uneindeutigen Basen enthielten und in denen Homopolymere mit einer Länge von maximal 8 bp vorkommen. Des Weiteren wurden nur Sequenzen verwendet, deren *Primer*-Sequenz korrekt war. Die *Primer*-Sequenzen sowie Chimären wurden entfernt. Mitochondriale Sequenzen wurden ebenso aus der Analyse ausgeschlossen. Auf Basis eines mit dem Silva-Programmpaket erstellten *Alignments* wurde mit Hilfe des Jukes-Cantor-Modells eine Spaltenbasierte Distanz-Matrix errechnet, auf deren Grundlage die Gruppierung der nach der Qualitätskontrolle verbliebenen Sequenzen in *operational taxonomic units* (OTUs) erfolgte. Dabei wurden Sequenzen mit einer Dissimilarität von $\leq 3\%$ einem OTU zugeordnet. Anschließend wurden die Sequenzen mit Hilfe der in Mothur integrierten Programmpaketen von RDP und Silva (Stand 02/2016) taxonomisch eingeordnet. Verglichen wurden diese Ergebnisse außerdem mit dem RDP-Classifizierer [RDP Naive Bayesian rRNA Classifizierer Version 2.10, <https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>, 16S rRNA training set 14, (134)]. Die Berechnung phylogenetischer Stammbäume erfolgte auf Grundlage des Yue & Clayton Dissimilaritätsindex (150). Zur Beurteilung der Diversität in den Proben und deren Abdeckung durch den erhobenen Datensatz wurden neben der Anzahl der OTUs sowie der Abdeckung („coverage“) ebenso verschiedene Diversitäts-Indices [inverser Simpson-Index (151), nicht-parametrischer Chao1-Index (152), „Abundance-based Coverage Estimator“ ACE (153)] sowie die Berechnung der *rarefaction*-Kurve (154) herangezogen. Bei letzterer wird die Zahl der OTUs über der Anzahl aller Sequenzen aufgetragen. Ein abflachender Verlauf einer solchen Kurve zeigt, dass durch Analyse weiterer

Sequenzen nur noch wenige neue OTUs erfasst werden und damit die Diversität in der Probe größtenteils durch die Analyse erfasst wurde.

2.4 *In situ Analytik*

2.4.1 *Gesamtzellzahlbestimmung*

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ) in den Proben erfolgte mit Hilfe des unspezifischen DNA-interkalierenden Farbstoffes Propidiumjodid. Dazu wurden zunächst ca. 0,3 g Probe abgewogen und mit Natriumazid (Endkonzentration 2,5 % [v/v], Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU) ü. N. fixiert. Nach einer sich anschließenden Verdünnung der Proben in PBS (1:10) (Tabelle 24) wurden die Zellen durch 20 s Ultraschall (20 % Leistung, 50 % relative Frequenzbelegungsdauer, Sonopuls HD70, Sonde UW70, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DEU) vereinzelt, davon 30 µl mit 70 µl PBS und 4 µl Propidiumjodid (1 mg/ml, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU) versetzt und im Dunkeln 15 min inkubiert. Danach wurde die Probe durch einen Polycarbonatfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm (isopore Membrane filters 0,2 µm GTP, Merck, Darmstadt, DEU) filtriert und der Filter in Citifluor (Citifluor Ltd. Canterbury, UK) eingebettet. Die Auswertung erfolgte durch manuelle Zählung von mindestens zehn zufällig gewählten Zählfeldern am Epifluoreszenzmikroskop Axiovert S100 (Carl Zeiss, Jena, DEU) mit Hilfe des Filtersatzes 14 (Anregung: BP 510-560, Strahlenteiler FT 580, Emission LP 590, Carl Zeiss, Jena, DEU).

Tabelle 24: Zusammensetzung einer PBS-Lösung.

Substanz	Hersteller	Konzentration
NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU	130 mM
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, DEU	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU	8 mM
KCl	AppliChem GmbH, Darmstadt, DEU	2,7 mM

2.4.2 *Catalyzed reporter deposition Fluoreszenz in situ Hybridisierung (CARD-FISH)*

2.4.2.1 Klassische CARD-FISH

[optimiert für Sedimentproben nach (155) und (116)]

In Vorbereitung für die CARD-FISH mussten die Proben zunächst fixiert werden. Dazu wurde zum einen ca. 0,25 g Probenmaterial mit Ethanol (EtOH, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU) in PBS

(Endkonzentration 50 % [v/v]) versetzt und bei -20 °C gelagert. Zum anderen wurden 0,25 g Probe in Formaldehyd (FA, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU) in PBS (Endkonzentration 2,8 % [v/v]) ü. N. bei 4 °C inkubiert, anschließend nach Zentrifugation (3 min, 13.000xg, Biofuge Fresco, Heraeus, Hanau, DEU) in 1 ml PBS gewaschen und zur Lagerung bei -20 °C in 50 % [v/v] EtOH (in PBS) resuspendiert.

Zur Vereinzelung der Zellen wurden die Proben anschließend 1:10 in PBS verdünnt und durch Ultraschallbehandlung (20 s, 20 % Leistung, 50 % relative Frequenzbelegungsdauer, Sonopuls HD70, Sonde UW70, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DEU) homogenisiert. Anschließend wurden 5 µl davon auf mit 0,1 %iger [w/v] Gelatine (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU) beschichtete Objektträger (Epoxy-beschichtete Diagnostika-Objektträger, 10 Well, Menzel-Gläser, Braunschweig, DEU) aufgetragen, getrocknet und in 96 % EtOH (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU) dehydriert.

Im Anschluss wurden die Zellen durch Lysozym- und Achromopeptidase-Behandlung permeabilisiert. Dazu wurden zunächst 20 µl einer frisch hergestellten Lysozymlösung (Tabelle 26) pro Probenkammer aufgetragen und der Objektträger in einer feuchten Kammer 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem einminütigen Waschschrift in Aqua dest. (RT) wurden 160 µl frisch hergestellte Achromopeptidaselösung (60 U/ml in NaCl/Tris/HCl Puffer, Tabelle 26, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU) pro Objektträger aufgetragen und dieser erneut 30 min in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger in Aqua dest. gewaschen (1 min, RT) und endogene Peroxidasen durch 30 minütige Inkubation in 0,15 % [v/v] Wasserstoffperoxid gelöst in Methanol (MetOH) inaktiviert. Nach einem weiteren Waschschrift in Aqua dest. (1 min, RT) wurden die Proben in 96 % EtOH dehydriert.

Die Hybridisierung erfolgte ü. N. bei 46 °C (Hybridisierungsofen Grant Boekel HIR10M, Grant Instruments, Shepreth, UK) in einer feuchten Kammer. Dazu wurden 5 ng/µl Oligonukleotidsonde (Tabelle 25) in 10 µl Hybridisierungspuffer (Tabelle 26) mit der entsprechenden Formamidkonzentration (Tabelle 25) pro Probenkammer aufgetragen.

Zur Beendigung der Hybridisierung wurde die Oligonukleotidsonde zunächst mit Waschpuffer (Tabelle 26) abgespült und der Objektträger anschließend 10 min bei 46 °C in Waschpuffer inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS (15 min, RT) erfolgte die Signalamplifikation durch Zugabe von 500 µl frisch hergestellter FITC-Tyramid-Lösung (Tabelle 26) pro Objektträger und 30 minütiger Inkubation bei 46 °C in einer feuchten Kammer. Anschließend wurde der Objektträger erneut bei RT unter Lichtausschluss gewaschen (10 min in PBS und zweimal 1 min in Aqua dest.) und in 96 % EtOH dehydriert. Durch Auftragen von 20 µl (5 µg/ml) des unspezifischen, DNA-interkalierenden Farbstoffes Propidiumjodid (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU) und die sich anschließende 15 minütige Inkubation bei RT und unter Lichtausschluss konnten alle Zellen gegengefärbt werden. Abschließend wurde das Propidiumjodid mit Aqua dest. entfernt und die Proben nach Lufttrocknung in Citifluor (Citifluor Ltd. Canterbury, UK) eingebettet.

Tabelle 25: Für die CARD-FISH verwendete Oligonukleotidsonden, deren 5'-3'-Sequenz, Spezifität und die im Hybridisierungspuffer enthaltene Formamidkonzentration.

Oligo-nukleotid-sonde	5'-3'-Sequenz	Spezifität	Formamidkonzentration [% v/v]	Referenz
EUB338 I	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	<i>Bacteria</i>	0	(156)
EUB338 II	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	<i>Planctomycetales</i>		(157)
EUB338 III	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	<i>Verrucomicrobiales</i>		
A915	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	<i>Archaea</i>	20	(126)
MSMX860	GGC TCG CTT CAC GGC TTC CCT	<i>Methanosarcinales</i>	45	(158)

Alle hier aufgeführten Sonden binden Bereiche der 16S rDNA und wurden mit 5'-seitiger HRP-Markierung von Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, DEU bezogen.

Die mikroskopische Auswertung erfolgte am Epifluoreszenzmikroskop Axiovert S100 (Carl Zeiss, Jena, DEU) mit Hilfe des Filtersatzes 14 (Anregung: BP 450-490, Strahlenteiler FT 510, Emission LP 590, Carl Zeiss, Jena, DEU) für die Gesamtzellzählfärbung mit Propidiumjodid und Filtersatz 44 (Anregung: BP 475/40, Strahlenteiler FT 500, Emission LP 530/50, Carl Zeiss, Jena, DEU) für das spezifische Sondensignal. Dabei wurden mindestens fünf zufällig gewählte Zählfelder mit insgesamt mindestens 400 Zellen (*Bacteria* und *Archaea*) bzw. mindestens zehn Zählfelder (*Methanosarcina*) ausgezählt und jeweils der Anteil der spezifischen Sondensignale an der Gesamtzellzahl bestimmt. Die relative Abundanz der Mikroorganismen ergab sich jeweils aus dem Mittelwert aller Zählungen.

Tabelle 26: Für die CARD-FISH verwendete Lösungen.

Lösung	Substanz	Hersteller	Eingesetzte Konzentration
LysozymbLösung (gelöst in Aqua dest.)	Lysozym	Merck KGaA, Darmstadt, DEU	10 mg/ml
	EDTA (pH 8)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU	0,05 M
	Tris/HCl (pH 7,4)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU/ VWR International, Darmstadt, DEU	0,1 M
NaCl/Tris/HCl Puffer (gelöst in Aqua dest.)	NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU	0,01 M
	Tris/HCl (pH 7,4)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU/ VWR International, Darmstadt, DEU	0,01 M

Tabelle 26 (Fortsetzung): Für die CARD-FISH verwendete Lösungen.

	NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D)	0,9 M
Hybridisierungspuffer (gelöst durch Erhitzen auf 40 °C- 60 °C in Aqua dest.)	Tris/HCl (pH7,4)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU/ VWR International, Darmstadt, DEU	0,02 M
	Blocking Reagenz	Roche, Berlin, DEU	1 % [w/v]
	Sodiumdodecyl- sulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU	0,01 % [w/v]
	Dextransulfat (Natriumsalz)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU	0,1 g/ml
	Formamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU	0-45 % [v/v] (siehe Tabelle 25)
Blocking Reagenz (gelöst in Maleinsäurepuffer)	Blocking Reagenz	Roche, Berlin, DEU	10 % [w/v]
Maleinsäurepuffer (pH 7,5, gelöst in Aqua dest.)	Maleinsäure	Merck KGaA, Darmstadt, DEU	100 mM
	NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU)	150 mM
Waschpuffer (gelöst in Aqua dest.)	NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU	0,135 M (≤ 20 % Formamid) 0,042 M (≥ 20 % Formamid)
	Tris/HCl (pH 7,4)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU/ VWR International, Darmstadt, DEU	20 mM
	EDTA (pH 8)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU	5 mM
	SDS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU	0,01 % [w/v]
	H ₂ O ₂ in PBS (0,15 % [v/v])	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU	10 µl/ml
FITC-Tyramid-Lösung (gelöst in Amplifikationspuffer)	FITC-Tyramid*	Zur Verfügung gestellt von Dr. Kerstin Röske (Sächsische Akademie der Wissenschaften, Leipzig, DEU)	1µl/ml
Amplifikationspuffer (gelöst durch Erhitzen auf 40 °C- 60 °C in 1x PBS)	Blocking Reagenz	Roche, Berlin, DEU	0,1 % [w/v]
	NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU	2 M
	Dextransulfat (Natriumsalz)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU	0,1 g/ml

*Das FITC-Tyramid wurde in DMF mit 20 mg/ml IPBA (je Sigma-Aldrich®, Taufkirchen, DEU) zur Minimierung des Ausbleichens gelöst und bei -20 °C gelagert.

2.4.2.2 Optimierung der CARD-FISH

Da unter Verwendung eines klassischen CARD-FISH Protokolls, wie unter 2.4.2.1 beschrieben, keine Hybridisierung der Zellen aus Biogasschlamm möglich war, wurden verschiedene Optimierungsschritte unternommen, deren Durchführung im Folgenden beschrieben ist.

Zellfixierung: Zur Fixierung in EtOH (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU) wurden ca. 0,25 g Probe in EtOH/PBS (Endkonzentration Ethanol: 25 % bzw. 50 % [v/v]) in einem Volumen von 2 ml aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Die Fixierung in FA (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU) erfolgte durch Zugabe von FA in PBS (Endkonzentration FA: 2,8 % [v/v], Endvolumen 2 ml) zu 0,05 g bzw. 0,25 g Probe und anschließender Inkubation bei 4 °C, RT und 37 °C für 4 h bzw. ü. N. oder 2 Wochen bei 4 °C. Zur Lagerung bei -20 °C wurde das FA durch Zentrifugation (7 min, 13.000xg, Biofuge Fresco, Heraeus, Hanau, DEU) und dreimaliges Waschen in 1 ml PBS entfernt und die Probe in 50 % [v/v] EtOH in PBS aufgenommen. Durch Zugabe einer frisch hergestellten Paraformaldehydlösung (PFA, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU) in einer Endkonzentration von 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 % und 4 % (Endvolumen 1 ml) konnten Proben ebenfalls fixiert werden. Das Probenmaterial wurde in diesem Fixativ ü. N. bei 4 °C inkubiert, bevor es, wie bereits beschrieben, gewaschen und gelagert werden konnte. Das PFA wurde in 1x PBS durch Erhitzen auf 60 °C und Zugabe von 40 µl 0,5 N NaOH (Merck KGaA, Darmstadt, DEU) je 10 ml Endvolumen gelöst und der pH-Wert durch Titration mit 0,2 N HCl (VWR International, Darmstadt, DEU) auf 7,2 oder 9,4 eingestellt.

Zellaktivierung durch Begasen: Da für die erfolgreiche Hybridisierung das Vorhandensein aktiver Zellen essentiell ist, wurden einzelne Proben mit Wasserstoff begast. Dazu wurde die Probe in Balch-Kulturröhrchen (Glasgerätebau Ochs, Bovenden, DEU) bis zu einem Überdruck von 1,5 atm mit H₂/CO₂ (80 %:20 % [v/v]) begast (159) und im Anschluss ü. N. bei 40 °C inkubiert. Die Proben wurden im Anschluss wie oben beschrieben in 4 % PFA, pH 7,2 ü. N. fixiert.

Abschütteln der Zellen: Um die Zellen von in den Proben enthaltenen pflanzlichen Partikeln zu lösen, wurden ca. 1,5 g Probe mit 5 ml PBS versetzt und in einem 10 ml Reaktionsgefäß 10 min bei 600 rpm horizontal geschüttelt (Vortex-Genie 2, Scientific Industries Inc., New York, USA). Nachdem sich die festen Partikel der Probe abgesetzt hatten (ca. 2 min), wurden 500 µl des Überstandes in 25 % bzw. 50 % EtOH in PBS sowie 2 % und 4 % PFA in PBS (pH 7,2 und 9,4) wie beschrieben ü. N. fixiert.

Dialyse gegen SDS: Zur Elimination etwaiger Störstoffe wurden 0,05 g Probe zunächst wie oben beschrieben in FA fixiert, im Anschluss 1:10 in PBS verdünnt und 500 µl davon 2 h bei

Raumtemperatur gegen 400 ml 0,01 % [w/v] SDS in PBS dialysiert (Dialysierschlauch Visking, Cellulose, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU). Im Anschluss wurden 5 µl Probe für die klassische CARD-FISH, wie unter 2.4.2.1 beschrieben, eingesetzt.

Mikrowellenbehandlung [modifiziert nach (160)]: Um eine Permeabilisierung durch Mikrowellen zu erreichen, wurde die Probe zunächst 1:10 in PBS verdünnt und im 1,5 ml Reaktionsgefäß schwimmend im Wasserbad 8 min bei 700 W in der Mikrowelle (Continent MW800G, GGV Handelsgesellschaft mbH & Co. KG, Kaarst, DEU) inkubiert. Außerdem wurde eine Mikrowellenbehandlung auf dem Objektträger vor der Lysozym- und Achromopeptidasebehandlung sowohl mit als auch ohne vorheriges Auftragen von 20 µl Aqua dest. auf die Probenkammer durchgeführt.

Proteinase K Behandlung [modifiziert nach (119)]: Zur Permeabilisierung der Zellen wurden je 15 µl Proteinase K (Machery&Nagel, Düren, DEU) in verschiedenen Konzentrationen (15 µg/µl, 1,5 µg/µl, 0,15 µg/µl und 0,015 µg/µl) pro Probenkammer aufgetragen und 30 min bei 37 °C bzw. 15 min bei RT inkubiert. Um die Proteinase K zu inaktivieren, wurde der Objektträger anschließend 1 min in Aqua dest. gespült, 1 min in 96 % [v/v] EtOH dehydriert, getrocknet und 10 min bei 60 °C auf einem Metall-Thermoblock (A. Hartenstein GmbH, Würzburg, DEU) inkubiert. Im Folgenden wurde die klassische CARD-FISH durchgeführt, wie unter 2.4.2.1 beschrieben.

HCl-Behandlung [modifiziert nach (119)]: Eine weitere Methode zur Permeabilisierung der Zellen ist die Behandlung mit HCl (VWR International, Darmstadt, DEU). Dazu wurden 20 µl einer 0,02 M HCl-Lösung pro Probenkammer aufgetragen, der Objektträger 1 min bei RT inkubiert und anschließend mit Aqua dest. gespült. Die HCl-Behandlung wurde 1 bis 4x wiederholt und eine klassische CARD-FISH (siehe 2.4.2.1) schloss sich an.

Proteinase K Behandlung vor der Fixierung [modifiziert nach (161)]: Um bei der Hybridisierung störendes extrazelluläres Material abzubauen, wurde die Proteinase K Behandlung noch vor der Fixierung durchgeführt. Dazu wurden ca. 0,05 g Probe bzw. 50 µl deren Überstands nach 10 minütiger Zentrifugation (20.000xg, Sigma 3-18K Centrifuge, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, DEU) mit 15 µg/µl, 1,5 µg/µl oder 0,15 µg/µl in einem Gesamtvolumen von 250 µl in PBS versetzt und 15 min, 30 min bzw. 60 min bei 37 °C und 100-200 rpm (horizontal) inkubiert. Im Anschluss wurde der Probenüberstand nach kurzer Sedimentation der festen Bestandteile in FA in PBS, 4 %igen PFA in PBS (pH 7,2) oder 25 % EtOH in PBS fixiert, wie bereits beschrieben.

β-Amylase Behandlung vor der Fixierung [modifiziert nach (162)]: Zum enzymatischen Abbau extrazellulären Materials wurden zu ca. 0,05 g Probe je 0,5 U/ml, 1 U/ml bzw. 2 U/ml β-Amylase in PBS (Endvolumen 250 µl) zugegeben, 15 min bei 37 °C und 150 rpm (horizontal) inkubiert und der Überstand nach kurzem Absetzen in 4 %igen PFA in PBS (pH 7,2) fixiert (siehe oben).

2.4.2.3 Modifizierte CARD-FISH für Proben aus Biogasschlamm

Zur *in situ* Hybridisierung von Zellen aus Biogasschlamm wurde jeweils ca. 0,05 g Probe in einem Endvolumen von 250 µl PBS noch vor der Fixierung mit Pectinex (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU) und Tween 80 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU) vorbehandelt. Die Enzymbehandlung erfolgte durch Zugabe von 5 mU/ml Pectinex und anschließender 15 minütiger Inkubation bei 20 °C und 500 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg, DEU). Nach kurzer Sedimentation wurde im Folgenden der Probenüberstand in 4 % PFA in PBS (pH 7,2) fixiert, wie unter 2.4.2.2 beschrieben. Tween 80 wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml zugegeben und die Probe bei RT 2 min bei 600 rpm horizontal geschüttelt (Vortex-Genie 2, Scientific Industries Inc., New York, USA). Nach Zentrifugation (3 min, 13.000xg, Biofuge Fresco, Heraeus, Hanau, DEU) wurde die Probe in PBS gewaschen und zur Fixierung in 4 % PFA in PBS (pH 7,2) resuspendiert.

Die fixierten Proben wurden 1:5 in PBS verdünnt (bei Hybridisierung mit EUB338 I-III und A915), durch Ultraschall vereinzelt (10 s, 20 % Leistung, 50 % relative Frequenzbelegungsdauer, Sonopuls HD70, Sonde UW70, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DEU), 5 µl davon auf Epoxid-beschichtete Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, DEU) aufgetragen und nach Lufttrocknung 1 min in 96 %igem [v/v] EtOH dehydriert. Bei Hybridisierung mit der Sonde MSMX860 wurde die fixierte Probe unverdünnt verwendet. Die sich anschließende Lysozym-, Achromopeptidase- und Wasserstoffperoxidbehandlung wurde durchgeführt, wie unter 2.4.2.1 beschrieben. Zur Minimierung des Hintergrundes wurden die Proben im Folgenden 30 min mit 10 µl des entsprechenden Hybridisierungspuffers pro Probenkammer bei 46 °C inkubiert. Nach Abspülen des Puffers mit Aqua dest. und erneuter Dehydrierung der Proben (1 min, RT, 96 % [v/v] EtOH) wurde mit 10 ng/µl Sonde unter den in 2.4.2.1 erläuterten Bedingungen hybridisiert. Das Waschen der Objektträger, die Substratamplifikation, die Gegenfärbung sowie das Einbetten und die Auswertung erfolgten ebenfalls nach dem klassischen CARD-FISH-Protokoll.

2.5 Statistische Analysen

Die in dieser Arbeit dargestellten statistischen Analysen wurden mit Hilfe der Software RStudio v0.91.551 durchgeführt. Um statistisch signifikante Korrelationen zwischen verschiedenen Datenreihen

zu überprüfen, wurden die Daten mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests (163) zunächst auf Normalverteilung geprüft. Zur Bewertung der Korrelation wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (ρ) berechnet.

3 *ERGEBNISSE*

3.1 *Etablierung geeigneter Analyse-Methoden zur Untersuchung von Proben aus Biogasanlagen*

3.1.1 *DNA-Isolation*

3.1.1.1 Evaluation verschiedener Kit-Systeme

Als Grundlage für sich anschließende DNA-basierte Analysen, wie qPCR, DGGE, das Erstellen von Klonbanken und die 16S-Amplikon-Sequenzierung, ist die Isolation von Gesamt-DNA aus komplexen Proben von essentieller Bedeutung. Aufgrund von sehr diversen Zellwandstrukturen verschiedener Mikroorganismen kann die Effizienz der DNA-Isolation jedoch deutlich variieren und beeinflusst damit die Ergebnisse der sich darauf aufbauenden Analytik. Um die mikrobielle und insbesondere archaeele Gemeinschaft im Probenmaterial umfassend abbilden zu können, wurde daher die Eignung einiger kommerziell erhältlicher Kit-Systeme spezifisch für die Isolation von DNA aus Biogasschlamm-Proben verschiedenen Ursprungs evaluiert und der Einfluss auf nachfolgende DGGE- und qPCR-Analytik untersucht. Ausgewählt wurden dabei wegen der ähnlichen Komplexität des Probenmaterials drei Kit-Systeme zur DNA-Isolation aus Bodenproben (UC, PS und MN), ein für Stuhlproben spezialisiertes Kit-System, da der untersuchte Biogasschlamm auch tierische Faeces beinhaltet (Qia), sowie ein Kit-System für die DNA-Isolation aus Bakterienkulturen (Jet). Um die Qualität der DNA nach der Isolation zu bestimmen, wurde eine spektrophotometrische, sowie gelelektrophoretische Evaluierung des Eluats durchgeführt (Tabelle 27).

Wie aus dem Quotienten der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm (Tabelle 27) ersichtlich, konnte mit Hilfe der verschiedenen Kit-Systeme DNA sehr unterschiedlicher Qualität isoliert werden. Die DNA, die mit UC, PS und Jet isoliert wurde, zeigte ein hohes Maß an Verunreinigungen, was sich in einem 260/280-Quotienten von deutlich kleiner 1,8 widerspiegelt. Im Gegensatz dazu war die DNA-Qualität nach Isolation mit PS und Qia deutlich besser und das 260/280-Verhältnis lag zwischen 1,7 und 1,8. Unterschiede konnten auch in der isolierten DNA-Konzentration beobachtet werden. Die DNA-Isolation mit PS resultierte in allen Proben in einer vergleichsweise geringen DNA-Konzentration. Ebenso hatte die DNA aus beiden Proben der Anlage Ka nach Isolation mit Jet eine sehr geringe Konzentration. Die DNA-Konzentrationen nach Extraktion mit den anderen Kits-

Systemen waren dagegen deutlich höher. Vor allem mit Qia isolierte DNA zeichnete sich durch die höchsten Konzentrationen aus.

Tabelle 27: DNA-Konzentrationen und zugehörige 260/280 Quotienten.

	A, Mai 2013		A, Jul 2013		KA-F1, Jul 2013		KA-F2, Jul 2013	
	c_{DNA} [µg/g _{FM}]	260/280	c_{DNA} [µg/g _{FM}]	260/280	c_{DNA} [µg/g _{FM}]	260/280	c_{DNA} [µg/g _{FM}]	260/280
UC	8,2	1,04	4,4	1,05	3,6	1,39	4,6	1,41
	15,7	1,01	17,0	1,05	4,2	1,31	4,2	1,29
PS	8,4	1,19	2,7	1,13	4,2	1,48	3,4	1,55
	5,8	1,28	4,3	1,20	1,6	2,13	1,9	1,40
MN	20,0	1,83	6,3	1,74	4,0	1,81	2,3	1,58
	13,7	1,79	4,4	1,57	3,2	1,56	3,2	1,78
Qia	16,5	1,76	21,0	1,71	5,6	1,73	10,2	1,70
	18,6	1,80	15,6	1,72	7,1	1,77	6,8	1,83
Jet	14,8	0,95	49,5	1,15	0,9	1,18	1,0	1,27
	9,1	0,96	7,6	0,93	0,7	1,18	1,2	1,20

Die DNA-Isolation mit den verschiedenen Kit-Systemen wurde jeweils in Duplikaten durchgeführt. Die DNA-Konzentration (c_{DNA}) wurde jeweils auf das g Frischmasse (FM) bezogen.

Bei der spektrophotometrischen Messung muss jedoch beachtet werden, dass sie stark durch Störstoffe, wie Huminsäuren, beeinflusst wird, was zu Messungenauigkeiten und der Überschätzung der DNA-Konzentration führen kann. Daher wurde die DNA-Konzentration zusätzlich mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.3.3) bewertet (Abbildung 5). Im Gegensatz zur spektrophotometrischen Messung wurde mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese die höchste DNA-Konzentration nach Isolation mit MN in allen Proben nachgewiesen.

Um anschließend den Einfluss der DNA-Isolationsmethode auf Diversitätsuntersuchungen zu überprüfen, wurde die archaeele Biozönose mit Hilfe zweier spezifischer DGGEs untersucht. Dabei wurden jeweils die DNA-Isolation und PCR-Reaktionen in Duplikaten durchgeführt. Für die erste DGGE wurde die DNA der verschiedenen Proben mit dem *Primer*-Paar Parch519f und A915r_GC amplifiziert. Dabei gestaltete sich die Amplifikation von mit UC isolierter DNA problematisch, sodass hier nicht alle Replikate untersucht werden konnten. Die aus der DGGE resultierenden Signalprofile nach Isolation mit PS und MN waren in den Proben beider KA-Anlagen sehr ähnlich und zeigten die gleichen Hauptsignale (Abbildung 6, Pfeile). Auch bei Verwendung der anderen Kit-Systeme konnte eine ähnliche Signalverteilung detektiert werden, jedoch fehlten einige Signale bzw. kamen einige hinzu. Auffällig war außerdem ein teilweise sehr deutlicher Unterschied in der Signalintensität insbesondere nach Isolation mit Qia und Jet. Mit Ausnahme der mit UC isolierten Proben und der

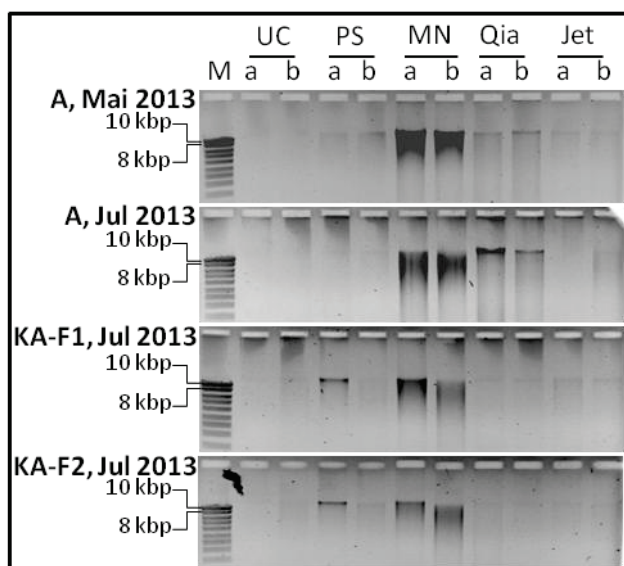


Abbildung 5: Gelelektrophoretische Darstellung der mit verschiedenen Kit-Systemen isolierten DNA aus Biogasschlamm.

Die DNA aus zwei Proben der Anlage A (Mai und Juli 2013) sowie der Anlage KA-F1 und KA-F2 (jeweils Juli 2013) wurde in Duplikaten (a, b) mit fünf verschiedenen Kits isoliert (UC, PS, MN, Qia und Jet) und 5 µl des Eluats gelelektrophoretisch aufgetrennt. M: Marker „10 kb Smart Ladder“.

variierenden Signalintensität waren sich die Replikate untereinander sehr ähnlich. In einem auf dieser Analyse beruhenden Dendrogramm konnten die größten Übereinstimmungen in der Probe KA-F1 nach Isolation mit MN beobachtet werden (siehe Anhang, Abbildung A1 B). Bei Verwendung der übrigen Kits bildeten lediglich die PCR-Replikate gleicher DNA-Isolationen ein Cluster. Von der Probe KA-F2 formten alle Replikate der Kits MN und PS sowie die PCR-Replikate der zweiten DNA-Isolation (b) mit UC ein Cluster.

Deutliche Unterschiede in der Signalverteilung waren in den Proben der Anlage A zu beobachten. Am ähnlichsten waren sich hier die DGGE-Profile der Probe vom Juli 2013 bei Verwendung von MN und Qia. Dementsprechend befanden diese Replikate in einem Cluster im entsprechenden Dendrogramm (siehe Anhang, Abbildung A1 A). Allerdings waren stärkere Variationen in den Replikaten der Qia-DNA zu sehen. Einige der Hauptsignale konnten ebenfalls in den Jet-Proben detektiert werden, jedoch waren die Unterschiede in den Replikaten hier noch ausgeprägter als bei Qia. Die DGGE-Muster nach Isolation mit UC und PS zeigten kaum Ähnlichkeiten zu denen der übrigen Kits und zeichneten sich durch eine nur sehr geringe Signalanzahl aus. Dementsprechend bildeten diese Proben ein separates Cluster. Bei Untersuchung der Probe vom Mai 2013 bildete sich ein Cluster aller MN- und drei der PS-Replikate. Einige Hauptsignale waren auch mit Hilfe des Qia- und Jet-Kits zu detektieren und diese Proben formten ein weiteres Cluster im Dendrogramm. Die Variationen in den einzelnen Replikaten waren jedoch sehr groß.

Die Resultate dieser DGGE zeigten eine deutliche Abhängigkeit von der Probenherkunft. Während die Unterschiede zwischen den Kit-Systemen in den Proben der Anlage KA nur sehr gering waren, konnten sehr deutliche Unterschiede in den Proben der Anlage A detektiert werden. Lediglich die DNA-Isolation mit MN schien für alle Proben gleichermaßen geeignet zu sein.

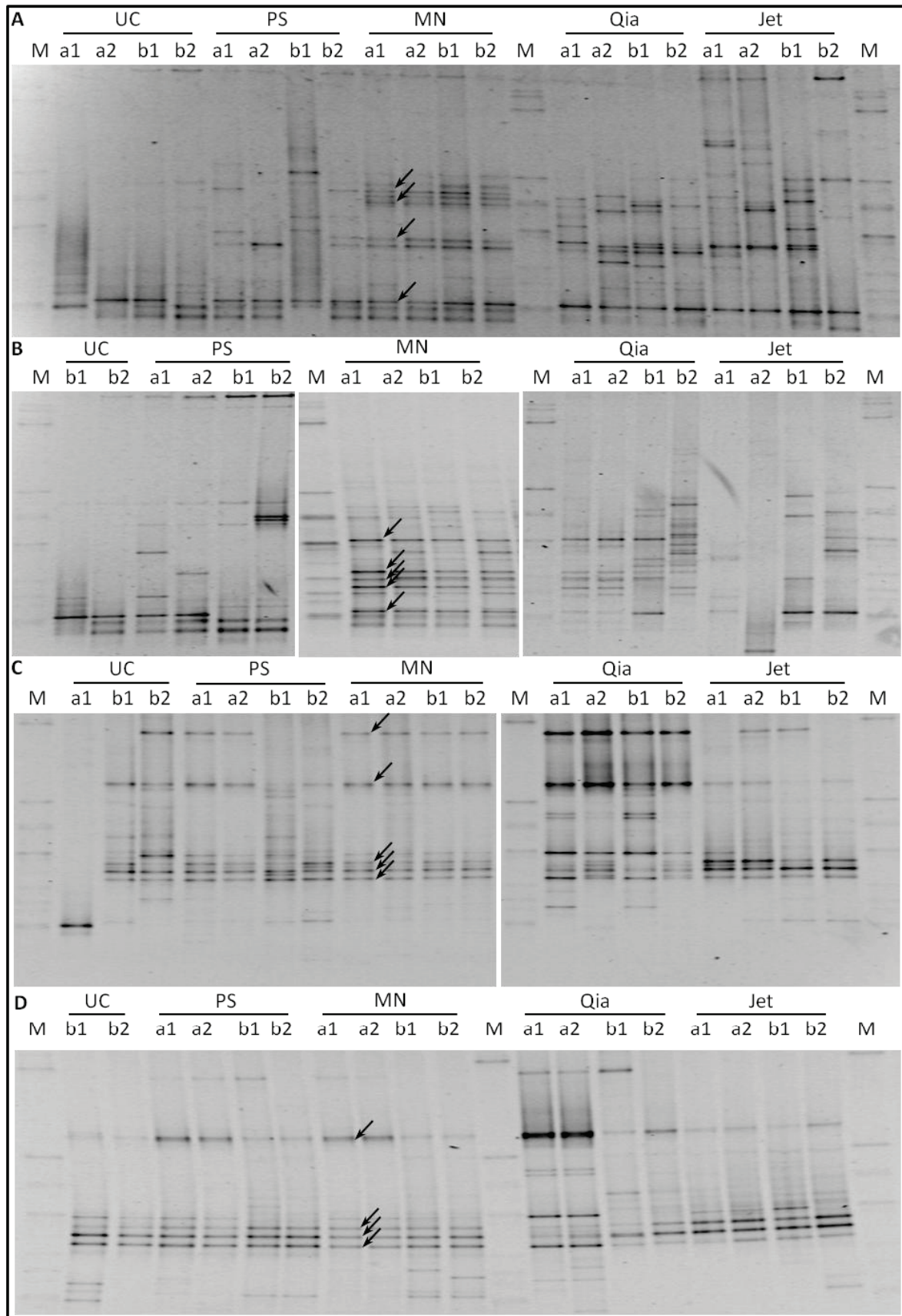


Abbildung 6: Archaeelle DGGE-Profil (Primer: Parch519f und A915r_GC) nach DNA-Isolation mit verschiedenen Kit-Systemen.

Aus den Anlagen A [Mai (A) und Juli 2013 (B)] sowie KA-F1 (C) und KA-F2 (D) (jeweils Juli 2013) wurde die DNA in Duplikaten (a, b) isoliert, das DGGE-Fragment jeweils in Duplikaten (1, 2) amplifiziert und mittels DGGE aufgetrennt. Bei fehlenden Proben war eine Amplifikation nicht möglich. Schwarze Pfeile markieren Hauptsignale. M: Marker.

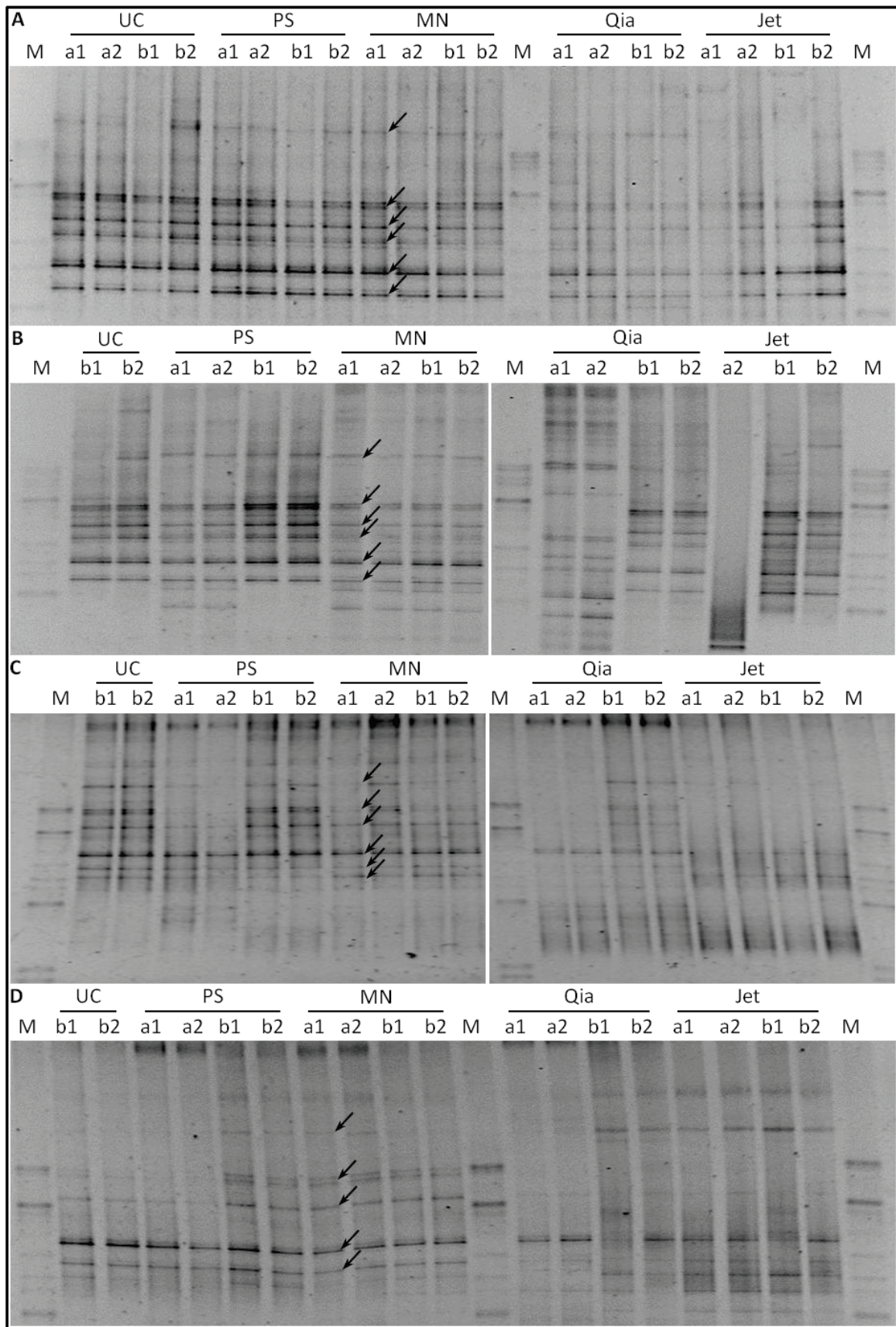


Abbildung 7: Archaeelle DGGE-Profile (Primer: Parch340f und A915r_GC) nach DNA-Isolation mit verschiedenen Kit-Systemen.

Nach Isolation der DNA in Duplikaten (a, b) aus den Anlagen A [Mai (A) und Juli 2013 (B)] sowie KA-F1 (C) und KA-F2 (D) (jeweils Juli 2013) wurde das DGGE-Fragment jeweils in Duplikaten (1,2) amplifiziert und mittels DGGE untersucht. Bei fehlenden Proben war eine Amplifikation nicht möglich. Schwarze Pfeile markieren Hauptsignale. M: Marker.

In einer zweiten DGGE, bei der das *Primer*-Paar Parch340f und A915r_GC verwendet wurde, sollten diese Ergebnisse validiert werden. Wie bereits bei der ersten DGGE zeigten sich auch hier sehr ähnliche Signalprofile in den Proben der KA-Anlagen (Abbildung 7). Allerdings variierten die Intensitäten einiger Signale in den verschiedenen Replikaten nach DNA-Isolation mit PS und Qia. Zudem konnten in Qia- und Jet-Proben weniger Signale detektiert werden, die zusätzlich eine geringe Intensität zeigten. Dementsprechend bildeten diese Proben separate Cluster im entsprechenden Dendrogramm (siehe Anhang, Abbildung A2 B). Im Gegensatz zur ersten DGGE war die Signalverteilung in den Proben aus Anlage A mit allen Kit-Systemen sehr ähnlich und die Replikate aller Kits der Probe vom Mai 2013 bildeten ein Cluster (siehe Anhang, Abbildung A2 A). Lediglich in Proben, die mit Qia und Jet isoliert wurden, wurden Unterschiede in den Replikaten deutlich. Bei Untersuchung der Probe vom Juli 2013 bildeten die Replikate nach Isolation mit PS und MN ein Cluster.

In beiden DGGEs konnte die größte Signalanzahl für alle untersuchten Proben in den MN-Isolaten nachgewiesen werden. Außerdem waren die DGGE-Resultate, die auf der Isolation mit MN aufbauten, sowohl bei unabhängigen DNA-Isolationen als auch individuellen PCR-Amplifikationen am besten reproduzierbar.

Da bekannt ist, dass auch *Methanobacteriales* in Biogasanlagen eine Rolle spielen (164) (165), wurde zusätzlich eine für diese Ordnung spezifische DGGE mit dem *Primer*-Paar Mbt857f_GC und Mbt1196r durchgeführt. Dabei konnten sehr ähnliche DGGE-Profile in den Proben der Anlage A nach Isolation mit MN, Qia und Jet detektiert werden (Abbildung 8, schwarze Pfeile). Die Signalintensitäten variierten jedoch in Qia- und Jet-Isolaten (Abbildung 8, Sternchen). Außerdem fehlten insbesondere bei Jet einige Signale (Abbildung 8, weiße Pfeile). Auch in beiden Proben der Anlage KA zeigten sich deutliche Unterschiede in Abhängigkeit des verwendeten Kits. Insbesondere bei UC, aber zum Teil auch bei PS, Qia und Jet fehlten Signale oder waren nur sehr schwach ausgeprägt. Auffällig ist vor allem, dass sehr starke Variationen in den Replikaten bei UC, PS, Qia und Jet zu beobachten waren. Da die beiden Proben der KA-Anlage aus parallelen Reaktoren entnommen wurden, wurde ein ähnliches DGGE-Profil erwartet. Dieses konnte jedoch nur bei Verwendung von MN beobachtet werden. Außerdem wurden in der spezifischen *Methanobacteriales*-DGGE sehr deutliche Unterschiede zwischen den Replikaten detektiert. Davon ausgenommen sind lediglich die Qia-Isolate der Proben aus Anlage A sowie alle Proben nach Isolation mit MN. Wie schon bei den allgemeinen Archaea-DGGEs zeigte sich auch bei der Untersuchung der *Methanobacteriales*, dass die Diversität am besten nach Isolation mit MN widerspiegelt werden kann und die Resultate außerdem sehr gut reproduzierbar sind.

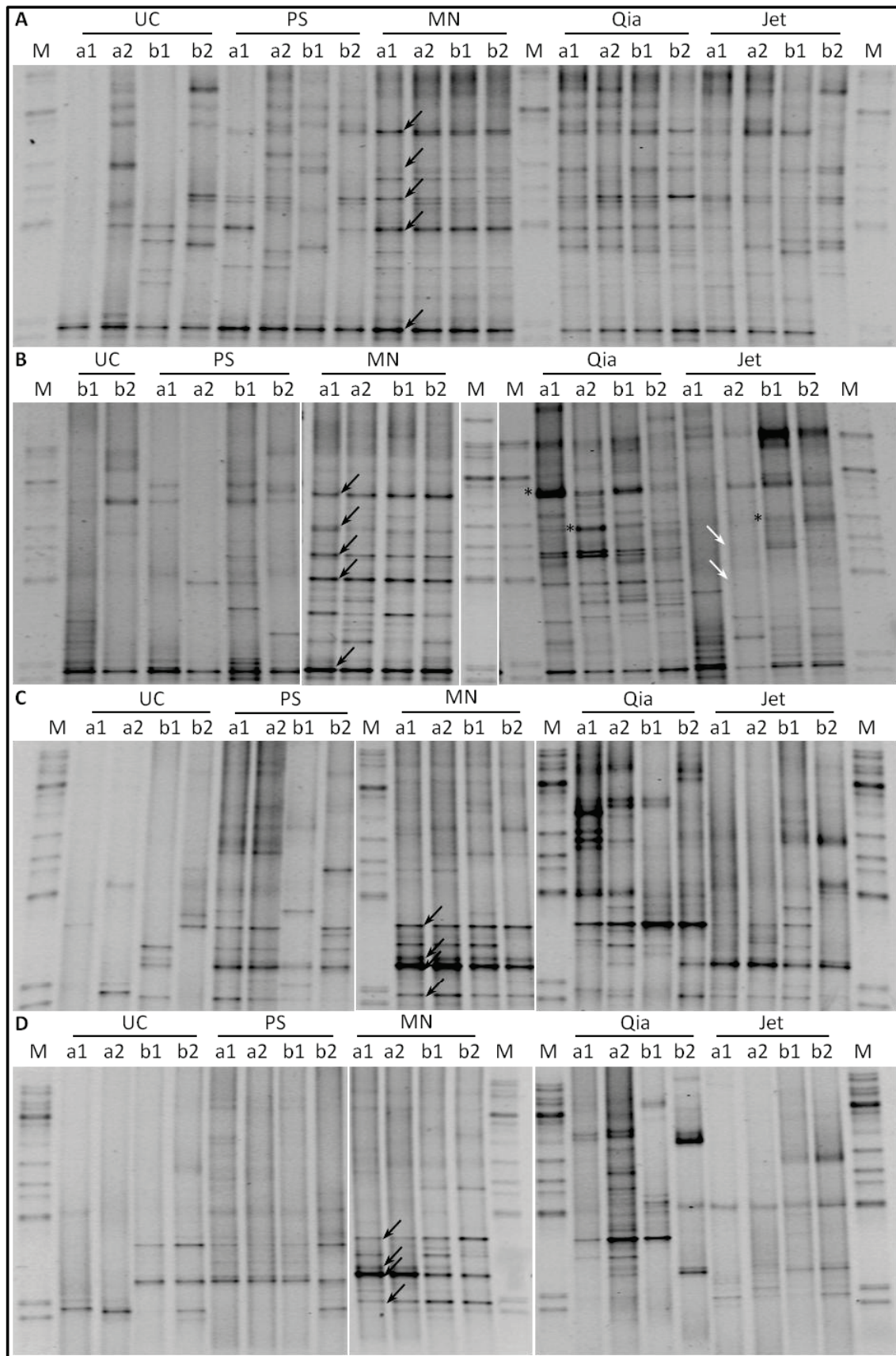


Abbildung 8: Spezifische *Methanobacteriales*-DGGE nach DNA-Isolation mit verschiedenen Kit-Systemen.

Die DNA wurde in Duplikaten (a, b) aus den Anlagen A [Mai (A) und Juli 2013 (B)] sowie KA-F1 (C) und KA-F2 (D) (jeweils Juli 2013) isoliert, das DGGE-Fragment mit dem *Primer*-Paar Mbt857f_GC und Mbt1196r jeweils in Duplikaten (1, 2) amplifiziert und mittels DGGE analysiert. Schwarze Pfeile markieren Hauptsignale, weiße Pfeile markieren fehlende Signale und Sternchen markieren deutlich variierende Signalintensitäten. M: Marker.

Neben der Visualisierung der Diversität in den Proben verschiedener Biogasanlagen ist auch die Bestimmung der Abundanz wichtiger Mikroorganismengruppen von großer Bedeutung für die Darstellung der mikrobiellen Biozönose. Um zu prüfen, ob die verwendete DNA-Isolationstechnik auch Einfluss auf die Bestimmung der mikrobiellen Zellzahl mittels qPCR hat, wurden qPCRs jeweils spezifisch für Bacteria und Archaea mit den DNA-Isolaten durchgeführt (Abbildung 9). Nach Isolation der DNA aus den Proben der Anlage A und KA-F2 mit Jet konnten die Zellzahlen nicht bestimmt werden, da das Hintergrundsignal nicht überschritten wurde und damit keine Ct-Werte ermittelt werden konnten. In Anlage KA-F1 konnten die Zellzahlen für Bacteria und Archaea nach Verwendung des Jet-Kit-Systems zwar ermittelt werden, diese lagen jedoch mit $3,6 \times 10^7$ Bacteria und $2,4 \times 10^6$ Archaea pro g Frischmasse (FM) etwa eine Größenordnung unter den mit den übrigen Kit-Systemen ermittelten Zellzahlen. Gleichermaßen waren die bakteriellen und archaeellen Zellzahlen nach Isolation mit UC in allen Proben sehr gering oder lagen unter der Nachweisgrenze. Im Gegensatz dazu resultierte die qPCR nach Verwendung von PS, MN und Qia in den Proben der KA-Anlagen in vergleichbaren Zellzahlen (10^9 Bacteria und 10^7 Archaea pro g FM). In den Proben der Anlage A konnten die höchsten Zellzahlen nach DNA-Isolation mit MN und Qia nachgewiesen werden (10^9 - 10^{10} Bacteria und 10^8 Archaea), während nach Verwendung von PS die Zellzahlen etwa eine Größenordnung unter denen von MN und Qia lagen. In allen Proben, unabhängig von deren Herkunft, konnten mit MN und Qia vergleichbare Zellzahlen sowohl für Bacteria als auch Archaea nachgewiesen werden. Allerdings war die Reproduzierbarkeit bei Verwendung des MN-Kit-Systems am besten. Da dieses Ergebnis in Übereinstimmung mit den Daten der DGGE ist, wurden folgende DNA Isolationen mit MN durchgeführt.

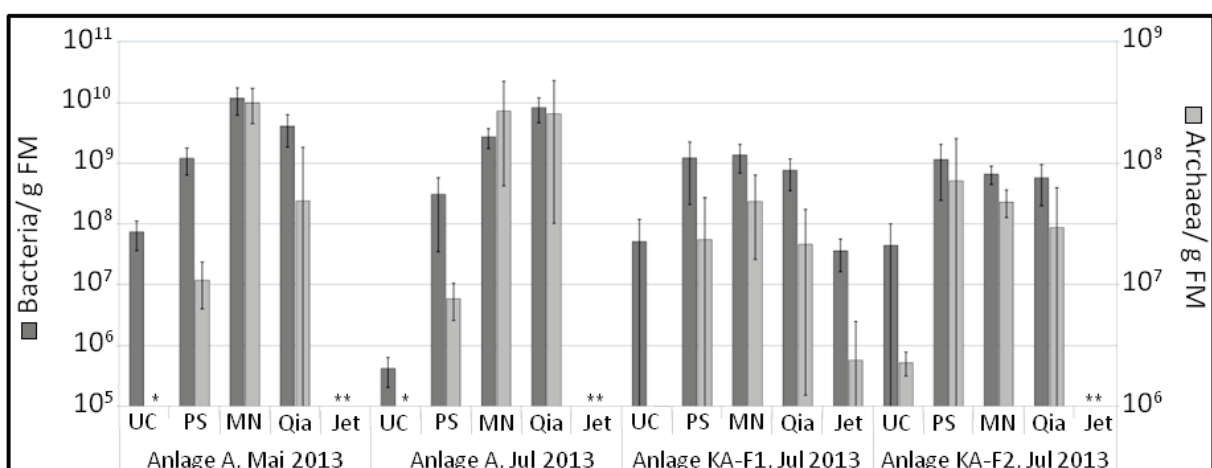


Abbildung 9: Mittels qPCR ermittelte Zellzahlen nach DNA-Isolation mit verschiedenen Kit-Systemen.

Nach Isolation der DNA mit fünf verschiedenen Kit-Systemen (UC, PS, MN, Qia und Jet) in Duplikaten wurden die Zellzahlen der Bacteria (dunkelgraue Balken, linke Achse) und Archaea (hellgraue Balken, rechte Achse) pro g Frischmasse (FM) mit Hilfe der qPCR in jeweils Duplikaten bestimmt. *: Ct-Werte nicht detektierbar.

3.1.1.2 Optimierung der eingesetzten Probenmenge

Nachdem ein geeignetes Kit-System für die Isolation von DNA aus Biogasschlamm gefunden war, sollte die optimale Menge an Probenmaterial, die für die Isolation eingesetzt wird, ermittelt werden. Da die DNA-Isolation auf der Bindung der DNA an einer Silica-Membran beruht, kann es durch Sättigung dieser zum Verlust an DNA kommen, der die nachfolgenden Ergebnisse verfälscht. Insbesondere die Abundanz von Mikroorganismen könnte dadurch deutlich unterschätzt werden. Daher wurde die DNA zweier weiterer Proben aus Anlage A (Okt 2013, Nov 2013) aus lediglich 0,2 g und 0,05 g Probenmaterial, anstelle der bisher verwendeten und vom Hersteller empfohlenen 0,4 g, isoliert.

Tabelle 28: DNA-Konzentrationen, zugehörige 260/280-Quotienten und Ct-Werte in Abhängigkeit verschiedener zur DNA-Isolation eingesetzter Probenmengen.

Probe	c_{DNA} [ng/μl] ^a	c_{DNA} [μg/g _{FM}] ^b	260/280	Ct Bacteria	Ct Archaea
Okt 2013; 0,2 g	14,0	3,5	1,61	15,5 ± 0,2	25,0 ± 0,3
Okt 2013; 0,05 g	14,1	13,0	1,83	14,4 ± 0,1	23,6 ± 0,6
Nov 2013; 0,2 g	12,5	2,6	1,54	16,3 ± 0,1	26,3 ± 0,4
Nov 2013; 0,05 g	9,0	7,7	1,74	17,1 ± 0,2	27,0 ± 0,5

Nach Isolation der DNA mit MN ausgehend von 0,2 g bzw. 0,05 g Probe wurde die DNA-Konzentration (c_{DNA}) im Eluat (a) und bezogen auf das g FM (b) und der 260/280-Quotient spektrophotometrisch ermittelt. Anschließend wurden die Ct-Werte in spezifischen Bacteria- und Archaea-qPCRs ermittelt.

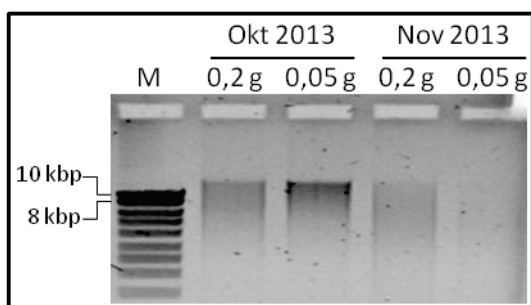


Abbildung 10: Isolierte DNA bei Verwendung von 0,2 und 0,05 g Probenmaterial.

Die DNA aus den entsprechenden Probenmengen wurde mittels MN isoliert und 5 μl des Eluats gelelektrophoretisch aufgetrennt. M: Marker „10 kb Smart Ladder“.

Durch die Verringerung der eingesetzten Probenmenge auf 0,05 g konnte die Reinheit der DNA in beiden Proben deutlich verbessert werden, was sich in einer Erhöhung des 260/280-Quotienten von 1,5-1,6 bei 0,2 g Probe auf 1,7-1,8 bei 0,05 g Probe widerspiegelt (Tabelle 28). Die im jeweiligen Eluat spektrophotometrisch gemessene DNA-Konzentration unterschied sich bei beiden Proben nur leicht, während nach gelelektrophoretischer Auftrennung die DNA-Konzentration der Probe vom Okt 2013 bei Einsatz von nur 0,05 g Probe sogar noch höher war, als mit 0,2 g Probenmaterial (Abbildung 10). Wenn die ermittelte DNA-Konzentration jedoch auf die eingesetzte Probenmenge bezogen wird, ergibt sich eine deutlich höhere DNA-Konzentration bei geringerem eingesetztem Probenvolumen. So war die DNA-Konzentration der Probe vom Nov 2013 im Eluat bei 0,05 g Probe geringer, als bei

0,2 g, die relative Konzentration pro Gramm Probe jedoch höher, was auf eine Sättigung der Säule bei 0,2 g Probenmaterial hindeutet. Ein Einfluss auf das DGGE-Profil in den Proben und damit der detektierten Diversität konnte nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die mittels qPCR bestimmten Ct-Werte in der November-Probe waren sowohl für Bacteria als auch für Archaea bei Verwendung des geringeren Probenvolumens etwas höher. Ein höherer Ct-Wert ist auf eine geringere DNA-Konzentration in der Probe zurückzuführen und bestätigt das Ergebnis der DNA-Konzentrationsbestimmung. Demnach scheint bei Verwendung von 0,05 g der Probe vom Nov 2013 keine Sättigung der Säule mehr aufzutreten. Bezogen auf das Gramm Probenmaterial ergibt sich bei geringerer Einwaage aber ähnlichem Ct-Wert eine höhere Zellzahl. Im Gegensatz dazu waren die Ct-Werte der Oktober-Probe etwas geringer, wenn weniger Probe zur DNA-Isolation eingesetzt wurde. Das kann zum einen auf die etwas höhere DNA-Konzentration im Eluat, zum anderen aber auch auf die verbesserte Reinheit bei Verwendung eines geringeren Probenvolumens zurückgeführt werden.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Verringerung des eingesetzten Probenvolumens auf lediglich 0,05 g Probenmaterial geeignet ist, um einem Sättigen der Silica-Membran vorzubeugen. Bei der Probe vom Okt 2013 schien allerdings selbst diese geringe Menge noch zur Sättigung zu führen. Eine Verwendung noch geringerer Probenvolumina ist jedoch aufgrund der Probeninhomogenität nicht empfehlenswert. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Analysen jeweils 0,05 g Probenmaterial für die DNA-Isolation eingesetzt.

3.1.2 Optimierung der DGGE

Die sequenzspezifische Auftrennung von PCR-Produkten mit Hilfe der DGGE ist eine häufig angewandte Methode, um die Diversität von Mikroorganismen aus komplexen Proben zu visualisieren. Die dabei erzielten Ergebnisse werden insbesondere von der für die DGGE-PCR genutzten *Primer*-Kombinationen beeinflusst. Die gewählten *Primer* sollten zum einen die Diversität des zu untersuchenden Taxons in den Proben spezifisch, aber auch umfassend abdecken. Zum anderen muss jedoch beachtet werden, dass mit steigender Länge der Amplifikate die Trennschärfe in der DGGE abnimmt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Darstellung der Diversität basierend auf dem 16S rDNA Gen (*rrs*) gewählt, das sich durch seine Konserviertheit in allen Organismen aber auch durch das Vorkommen hypervariabler (V)-Regionen besonders für die phylogenetische Einordnung von Organismen eignet. Es ist bekannt, dass der 5'-seitige Bereich des *rrs*-Gens in der Domäne der Archaea größere Variationen zeigt, als der 3'-seitige Bereich und vor allem die V3-Region besonders geeignet ist, um die archaeele Diversität zu erfassen (166). Dementsprechend wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene *Primer*-Kombinationen für die DGGE-Analytik getestet, die die V3-Region umfassen. Um jedoch mehr Sequenzinformation für eine bessere phylogenetische Zuordnung von

Schlüsselorganismen zu erhalten, wurden die Amplifikate um benachbarte hypervariable Regionen erweitert, wie es bereits aus bisherigen Studien zur Diversität in Biogasanlagen bekannt ist (167) (168) (169) (170). Zudem wurde das *Primer*-Paar Arc787f_GC und Arc1059r in die Analyse mit einbezogen, da es in der Literatur häufig für Diversitätsuntersuchungen in Biogasproben verwendet wird (164) (171) (172). Anhand dieser Kriterien wurden 18 *Primer*-Paare ausgewählt, die zunächst hinsichtlich der Amplifizierbarkeit der entsprechenden Fragmente untersucht wurden. Dazu wurden zum einen je eine Probe aus Anlage A (Jul, Okt bzw. Nov 2013) sowie ein durch Klonierung der Probe von Jul 2013 (Anlage A) generierter Klon, der dem Genus *Methanoculleus* zugeordnet werden konnte, mittels PCR (siehe 2.3.2) amplifiziert (Tabelle 29).

Tabelle 29: Für die DGGE getestete *Primer*-Kombinationen, deren amplifizierte Hypervariable Region und das PCR-Resultat.

<i>Primer</i> vorwärts	<i>Primer</i> revers	Hypervariable Region	PCR-Ergebnis
SAf_GC	Parch519r	V3	Klon: negativ BG: mehrere Signale
	Ar806r	V3, V4	Klon und BG je ein Signal
	A915r	V3, V4, V5	Klon: ein Signal BG: negativ
	Ar9r	V3, V4, V5	Klon und BG je ein Signal
A349f_GC	Parch519f	V3	Klon und BG negativ
	A806r	V3, V4	Klon und BG negativ
	A915r	V3, V4, V5	Klon: ein Signal BG: negativ
	Ar9r	V3, V4, V5	Klon: ein Signal BG: negativ
A109f_GC	SAr	V2, V3	Klon und BG je ein Signal
	Parch519r	V2, V3	Klon und BG je ein Signal
	A806r	V2, V3, V4	Klon und BG je ein Signal
A109f_GC	A915r	V2, V3, V4, V5	Klon: ein Signal BG: negativ
	Ar9r	V2, V3, V4, V5	Klon und BG je ein Signal
109f	A915r_GC	V2, V3, V4, V5	Klon und BG je ein Signal
349f		V3, V4, V5	Klon und BG negativ
Parch340f		V3, V4, V5	Klon und BG je ein Signal

Tabelle 29 (Fortsetzung): Für die DGGE getestete *Primer*-Kombinationen, deren amplifizierte Hypervariable Region und das PCR-Resultat.

<i>Primer</i> vorwärts	<i>Primer</i> revers	Hypervariable Region	PCR-Ergebnis
Parch519f		V4, V5	Klon und BG je ein Signal
A787f_GC	A1059r	V5, V6	Klon und BG je ein Signal

Wie aus Tabelle 29 zu entnehmen ist, war bereits die Amplifikation des entsprechenden DNA-Fragmentes mit einigen *Primer*-Kombinationen nicht möglich, sodass diese für die folgende DGGE-Analyse nicht mit verwendet wurden.

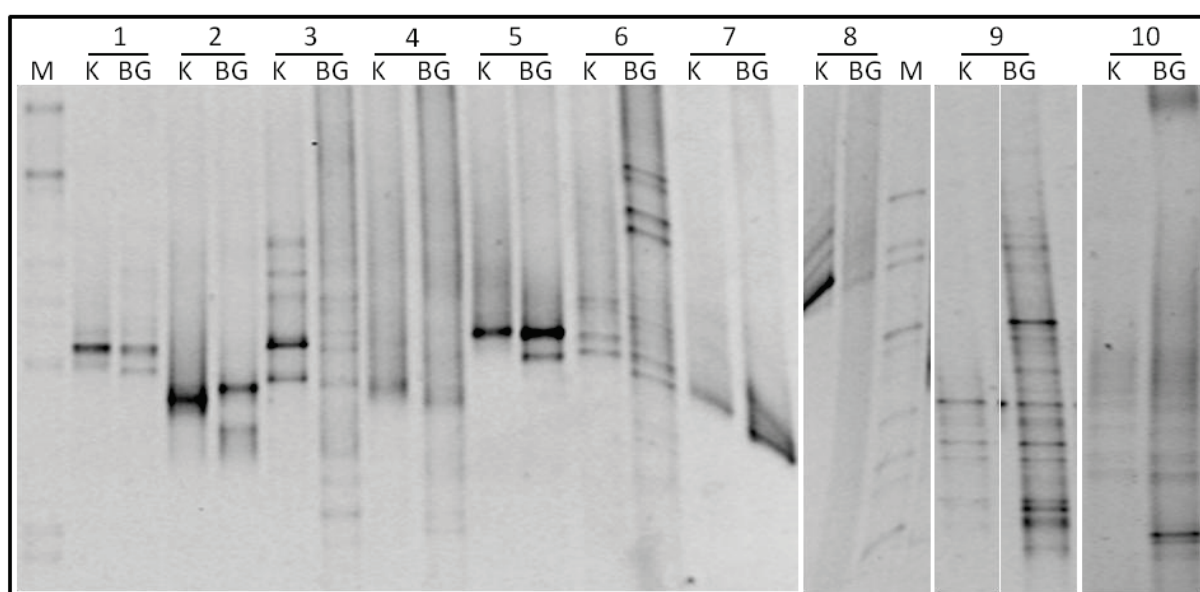


Abbildung 11: Test verschiedener *Primer*-Systeme zur Etablierung einer spezifischen Archaea-DGGE.

Spezifische Fragmente der archaeellen 16S rDNA wurden mit Hilfe verschiedener *Primer*-Paare von Proben der Anlage A (BG) bzw. aus einem Archaea-Klon der Anlage A (K) amplifiziert und dann auf einem 35-65 % (*Primer*-Paar 9) bzw. 40-70 % Gradienten mittels DGGE aufgetrennt. *Primer*-Paare: 1: SAf_GC/Ar806r, 2: SAf_GC/Ar9r, 3: Parch340f/A915r_GC, 4: A109f_GC/Parch519r, 5: A109f_GC/A806r, 6: A109f_GC/SAr, 7: A109f_GC/Ar9r, 8: 109f/A915r_GC, 9: Parch519f/A915r_GC, 10: A787f_GC/A1059r. M: Marker.

Dennoch konnten zehn *Primer*-Paare weiter bezüglich deren Eignung für die DGGE-Analyse untersucht werden. Acht davon amplifizieren in Übereinstimmung mit den Literaturdaten unter anderem die V3-Region einschließlich einer bis drei hypervariablen Regionen. Mit zwei weiteren *Primer*-Systemen werden die V4 und V5 bzw. V5 und V6 Region abgedeckt. Mit den *Primer*-Kombinationen 1, 2, 5, 7 und 8 (Abbildung 11) konnten bei der Probe aus Anlage A jedoch lediglich je ein bis drei Signale detektiert werden, während bei den *Primer*-Paaren 4 und 10 keine klar differenzierbaren Signale sichtbar wurden. Lediglich mit drei der getesteten *Primer*-Kombinationen (3: Parch340f/A915r_GC, 6: A109f_GC/SAr und 9: Parch519f/A915r_GC) konnte ein diverses DGGE-

Profil detektiert werden. Überraschend war zudem, dass bei diesen *Primer*-Systemen auch jeweils der untersuchte Klon durch mehrere Signale charakterisiert wurde.

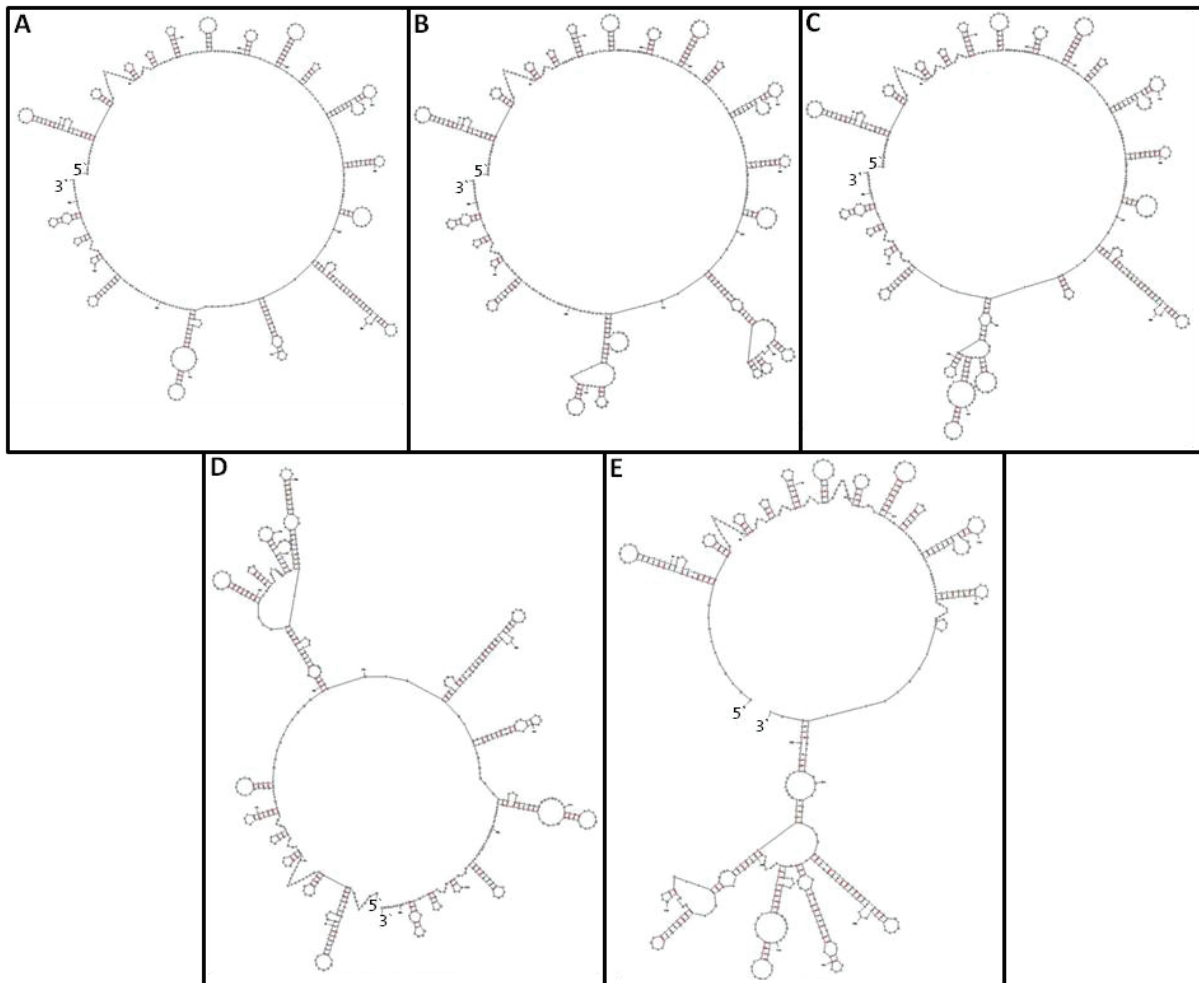


Abbildung 12: Berechnete potentielle Sekundärstrukturen des DGGE-Fragmentes eines Klons aus Anlage A.

Die potentiellen DNA-Sekundärstrukturen eines Klones aus Anlage A, der dem Genus *Methanoculleus* zugeordnet werden konnte, wurden mit Hilfe des Web Service „mfold“ berechnet. A-E zeigen fünf verschiedene mögliche Sekundärstrukturen, die das untersuchte DGGE-Fragment (*Primer*-Paar: Parch340f/A915r_GC) annehmen kann. Freie Enthalpien der einzelnen Strukturen: A: $\Delta G = -94,07$ kcal/mol; B: $\Delta G = -92,03$ kcal/mol; C: $\Delta G = -91,98$ kcal/mol; D: $\Delta G = -91,80$ kcal/mol; E: $\Delta G = -91,27$ kcal/mol.

Da bekannt ist, dass Mehrfachsignale durch Sekundärstrukturen des DNA-Fragmentes entstehen können (173), wurden mit Hilfe des Web Service „mfold“ potentielle Sekundärstrukturen des in der DGGE untersuchten Abschnittes der 16S rDNA berechnet und exemplarisch für einen Klon, der dem Genus *Methanoculleus* zugeordnet werden konnte, dargestellt (Abbildung 12). Die theoretisch postulierten Sekundärstrukturen zeichneten sich alle durch das Vorhandensein einer Vielzahl deutlich ausgeprägter *hairpin*-Strukturen aus. Dadurch können verschiedene Schmelzdomänen entstehen, die durch ein unterschiedliches Denaturierungsverhalten die Migrationseigenschaften des DNA-Fragmentes im DGGE-Gel derart bestimmen, dass eine einzelne

Sequenz in Form von mehreren Signalen sichtbar wird (173). Aus diesem Grund ist es nicht möglich, aus der Anzahl der detektierten Signale auf die Anzahl an Mikroorganismen in der Probe zu schließen. Da mit der *Primer*-Kombination 3 (Parch340f/A915r_GC) trotz der Mehrfachsignale geringe Sequenzvariabilität zwischen einzelnen Klonen am besten detektiert werden konnten, wurde im Folgenden dieses *Primer*-Paar zur Untersuchung der archaeellen Diversität mittels DGGE genutzt.

3.1.3 CARD-FISH

Die Quantifizierung wichtiger Mikroorganismengruppen in verschiedenen Biogasproben sollte neben der qPCR mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung erfolgen. Dazu wurde die Methodik der CARD-FISH ausgehend von einem modifizierten Protokoll zur Analyse der mikrobiellen Biozönose in Sedimentproben (155) für die vorliegenden Biogasproben weiter optimiert. Da die Zellen in Biogasproben von einer stark ausgeprägten extrazellulären Matrix umgeben sind, lag der Fokus dabei insbesondere auf der Erhöhung der Durchlässigkeit bzw. dem Abbau des nicht-zellulären Materials, der Permeabilisierung der Zellen, um die Zugänglichkeit der Sonden an die Ziel-rRNA zu verbessern, sowie der Verringerung von Hintergrundsignalen. Bereits die initiale Fixierung der Zellen hat einen entscheidenden Einfluss auf die spätere Hybridisierung, da es abhängig von der Zellwandstruktur zu verschieden starken Vernetzungen durch unterschiedliche Fixative kommen kann. Daher wurden vier Fixative (Natriumazid, Ethanol, Formaldehyd und Paraformaldehyd) in unterschiedlicher Form angewendet (Tabelle 30). Für die sich anschließende Permeabilisierung der Zellen sind verschiedene Vorbehandlungen beschrieben (111) (116). Zusätzlich zum häufig angewendeten Lysozym- und Achromopeptidase-Verdau wurden verschiedene Behandlungen mit Mikrowellen, Salzsäure und Proteinase K hinsichtlich ihres Einflusses auf die Hybridisierung untersucht (Tabelle 30).

Tabelle 30: Getestete Modifikationen zur Optimierung der CARD-FISH für Proben aus Biogasanlagen.

Arbeitsschritt	Durchführung nach (155)	Getestete Modifikation	Referenz
Fixierung der Zellen	0,25 g Probenmaterial in 2,8 % [v/v] FA/PBS oder 50 % [v/v] EtOH/ PBS, Fixierung ü. N. bei 4 °C	0,25 g und 0,05 g Probenmaterial	diese Arbeit
		„Aktivieren“ der Zellen durch Begasung mit H ₂ /CO ₂ (80 %/20 % [v/v])	diese Arbeit
		Fixierung in 25 %, 50 % [v/v] EtOH in PBS	diese Arbeit
		Fixierung in 2,5 % [v/v] Natriumazid	diese Arbeit
		Fixierung in 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 % [v/v] PFA, pH 7,2 und 9,4	diese Arbeit
		„doppelte“ Fixierung mit 2,5 % Natriumazid und 50 % EtOH	diese Arbeit
Probenvorbereitung	Verdünnung 1:10 in 1x PBS	Inkubation der Fixierung für 4 h (bei 4 °C, RT und 37 °C), ü. N. und 2 Wochen (je bei 4 °C)	diese Arbeit
		Verdünnungsstufen: Unverdünnt, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50	diese Arbeit
Probenvorbereitung	Verdünnung 1:10 in 1x PBS	Abschütteln der Zellen von enthaltenen Partikeln	diese Arbeit
Probenvorbereitung	Verdünnung 1:10 in 1x PBS	Dialyse gegen SDS in PBS	diese Arbeit
Vereinzeln der Zellen	milder Ultraschall (20 s, 20 % Leistung, 50 % relative Frequenzbelegungsdauer)	ohne Ultraschall, 5 s und 10 s Ultraschall	diese Arbeit

Tabelle 30 (Fortsetzung): Getestete Modifikationen zur Optimierung der CARD-FISH für Proben aus Biogasanlagen.

Arbeitsschritt	Durchführung nach (155)	Getestete Modifikation	Referenz
Permeabilisierung der Zellen (Lysozym- und (Achromopeptidase-Behandlung)	60 min, 37 °C, 10 mg/ml Lysozym und anschließend 30 min, 37 °C, 60 U/ml Achromopeptidase	Mikrowellenbehandlung	modifiziert nach (160)
		Proteinase K-Behandlung, 15 µg/µl, 1,5 µg/µl, 0,15 µg/µl, 0,015 µg/µl, 15 min bei RT und 30 min bei 37 °C, je mit und ohne Hitzeinaktivierung	modifiziert nach (119)
		HCl-Behandlung, 1-4x 0,02 M, je 1 min	modifiziert nach (119)
		Kombination von Mikrowellen-, Proteinase K- und HCl-Behandlung	diese Arbeit
Inaktivierung endogener Peroxydasen (Wasserstoffperoxid-Behandlung)	30 min, RT, 0,15 % [v/v] H ₂ O ₂ in MetOH	-	diese Arbeit
Hybridisierung	ü. N., 46 °C, 5 ng/µl Sonde	0,5 ng/µl, 5 ng/µl, 10 ng/µl Sonde	diese Arbeit

Da weder durch die modifizierte Fixierung und Probenvorbereitung noch die zusätzlichen Permeabilisierungsschritte eine reproduzierbare Hybridisierung der Zellen möglich war, wurde im Anschluss die Behandlung mit Proteinase K in verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten noch vor der Fixierung durchgeführt [modifiziert nach (161)]. Bei Fixierung des Überstands nach kurzer Sedimentation der festen Bestandteile ü. N. in 4 %igem [v/v] PFA in PBS ließen sich *Bacteria* hybridisieren, jedoch war eine Auswertung durch zahlreiche Hintergrundsignale nicht möglich (Abbildung 13, A). Um den Hintergrund zu minimieren, wurden die Zellen im Anschluss nicht durch Ultraschallbehandlung vereinzelt (Abbildung 13, B). Dadurch konnte der Hintergrund deutlich verringert werden, jedoch lagen die Zellen häufig in Clustern vor (Abbildung 13, C). Zudem konnten maximal ca. 50 % der Gesamtzellzahl als *Bacteria* identifiziert werden, was deutlich unter den erwarteten ca. 80-90 % liegt. Um die Hybridisierbarkeit der Proben weiter zu verbessern wurden zusätzlich Enzyme verwendet, die häufig für den Abbau mikrobieller Biofilme Anwendung finden. Dazu zählen insbesondere Amylasen, Cellulasen und Proteasen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Inkubation mit β -Amylase (162) ebenso getestet wie eine Vorbehandlung Pectinex, einem aus vor allem Pectinasen aber auch Cellulasen und Hemicellulasen bestehendem Enzympräparat, das zum Abbau extrazellulärer Polymere geeignet ist (174). Beide Vorbehandlungen führten zu einer Verbesserung der Hybridisierbarkeit auf bis zu ca. 65 % *Bacteria* (β -Amylase) und sogar bis zu ca. 80 % *Bacteria* (Pectinex). Allerdings bedingten auch diese Enzym-Behandlungen eine deutliche Erhöhung des unspezifischen Hintergrundes (Abbildung 13, D). Um die Spezifität der Fluoreszenzsignale zu erhöhen, enthält der verwendete Hybridisierungspuffer ein Blockier-Reagenz („*blocking reagent*“), das unspezifische Bindestellen blockieren und damit einer unspezifischen Hybridisierung durch die eingesetzten Oligonukleotidsonden vorbeugen soll. Dennoch wurden in den untersuchten Proben eine Vielzahl an störenden Falschsignalen detektiert, sodass eine zusätzliche Inkubation mit Hybridisierungspuffer ohne Oligonukleotidsonde durchgeführt wurde, wodurch der unspezifische Hintergrund verringert werden konnte. Im Folgenden wurde daher mit der Pectinex-Vorbehandlung und der zusätzlichen Inkubation mit Hybridisierungspuffer weitergearbeitet. Neben dieser enzymatischen Vorbehandlung konnte ebenso durch die Inkubation mit Tween 80 (175) (176) vor der Fixierung die Hybridisierbarkeit in den Proben deutlich verbessert und bis zu ca. 80 % *Bacteria* hybridisiert werden (Abbildung 13, E). Im Gegensatz zur Vorbehandlung mit Pectinex, bei der mit dem Überstand der Probe nach dem enzymatischen Verdau weitergearbeitet wird, wird bei der Tween 80-Behandlung das Zentrifugat fixiert. Um mögliche Unterschiede durch die Verwendung verschiedener Fraktionen zu berücksichtigen, wurden im Verlauf dieser Arbeit beide Vorbehandlungen parallel durchgeführt.

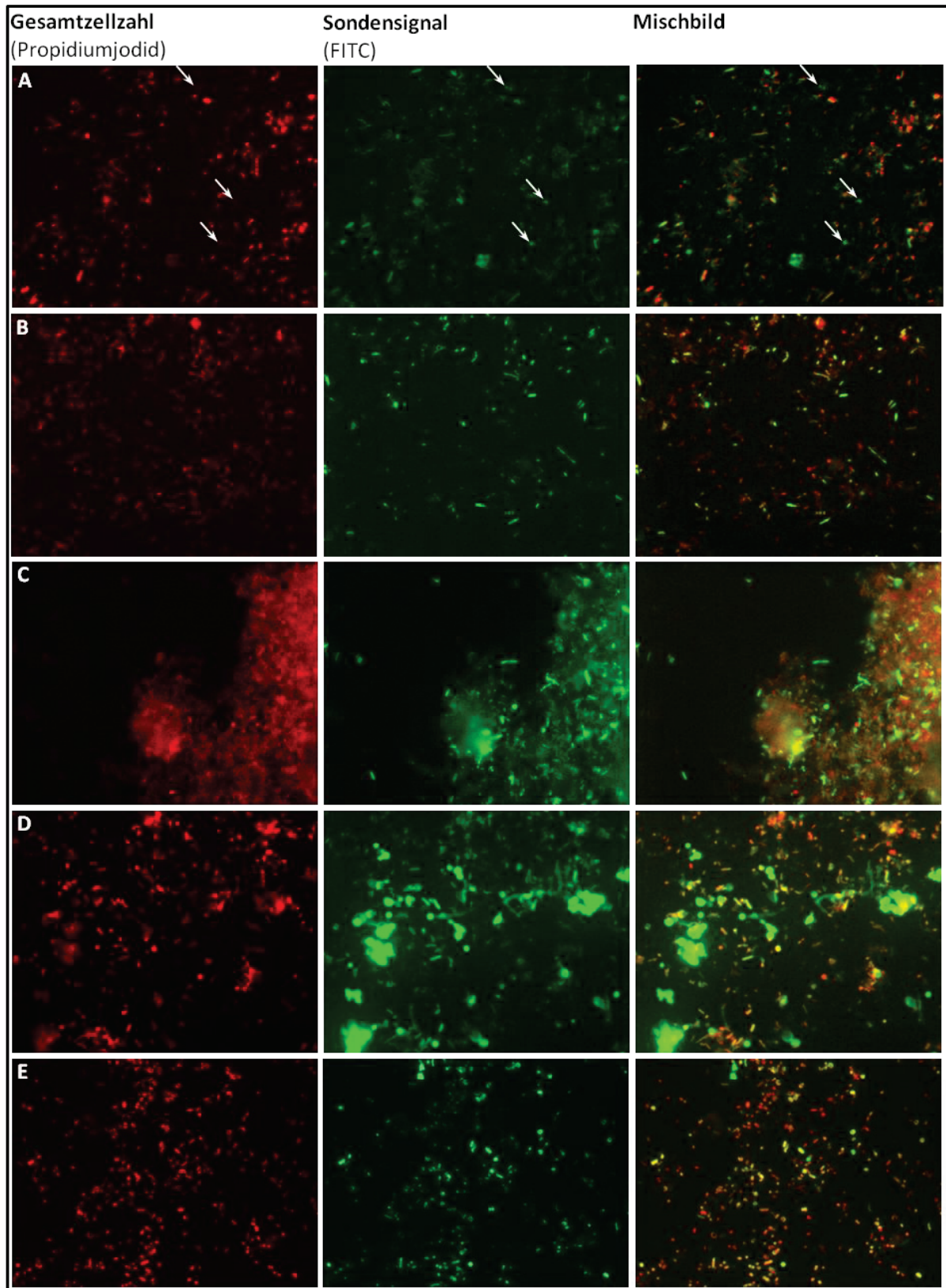


Abbildung 13: Einfluss der enzymatischen Vorbehandlung auf die CARD-FISH.

Einzelne Proben aus Anlage A wurden vor der Fixierung unterschiedlich vorbehandelt und nach dem klassischen CARD-FISH-Protokoll mit der Sonde EUBI-III hybridisiert. A: Vorbehandlung mit Proteinase K, Pfeile markieren unspezifische Sondensignale, B und C: Vorbehandlung mit Proteinase K, keine Ultraschallvereinzelung, D: Vorbehandlung mit Pectinex, E: Vorbehandlung mit Tween80 und zusätzliche Inkubation in Hybridisierungspuffer vor der Hybridisierung.

3.2 Archaeelle Diversität in verschiedenen Biogasanlagen

3.2.1 Archaeelle Biozönose der Anlage A

3.2.1.1 Normalbetrieb der Anlage

Einer der am häufigsten in Deutschland in Biogasanlagen als Substrat eingesetzter nachwachsender Rohstoff ist die Maissilage (6). Es ist daher von besonderem Interesse, die mikrobiellen Grundlagen der anaeroben Fermentation von Maissilage-betriebenen Biogasanlagen umfassend aufzuklären. Um insbesondere die Dynamik der methanogenen Biozönose genauer zu charakterisieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Anlage A, betrieben mit Maissilage, Hühnertrockenkot und Rindermist (siehe 2.1.1), über zwei Jahre hinweg monatlich untersucht. Zur Visualisierung der archaeellen Populationsdynamik kam dabei die DGGE zum Einsatz.

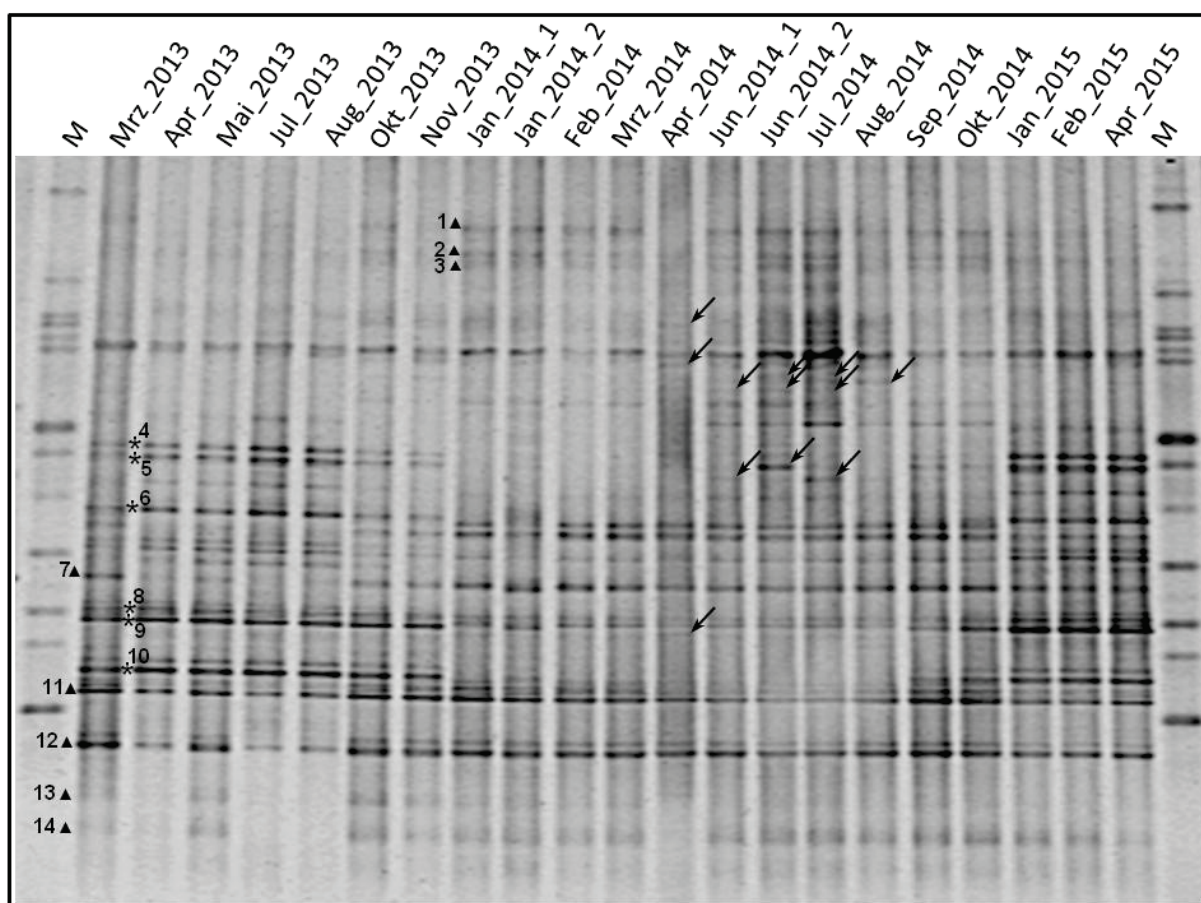


Abbildung 14: Mittels DGGE visualisierte archaeelle Dynamik in Anlage A.

Die mit Hilfe der Primer Parch340f und A915r_GC generierten archaeellen 16S rDNA Fragmente wurden elektrophoretisch in einem 40-70 % denaturierenden Gradienten aufgetrennt. Durch Sequenzierung von entsprechenden Klonen bzw. reamplifizierter DNA aus einzelnen Signalen konnten die nummerierten Signale identifiziert und den Genera *Methanoculleus* (Dreiecke) und *Methanosarcina* (Sternchen) zugeordnet werden. Pfeile: Leichte Variationen im Signalprofil, M: Marker.

Zur Identifikation relevanter Schlüsselorgansimen wurde außerdem die DNA aus Einzelsignalen der DGGE reamplifiziert und sequenziert. Zusätzlich wurde eine Klonbank aus der Probe vom Juli 2013 erstellt, prominente Einzelklone anhand ihrer Übereinstimmung mit DGGE-Signalen aus der Biogasprobe ausgewählt und ebenfalls sequenziert. Die meisten Signale konnten dabei lediglich zwei methanogenen Genera, *Methanoculleus* und *Methanosarcina*, zugeordnet werden (Abbildung 14, Tabelle 31).

Tabelle 31: Taxonomische Zuordnung der Archaea-DGGE-Signale aus Anlage A.

Signal	Identifikation durch	Klassifikation nach RDP [Konfidenz]	Nächster Verwandte nach NCBI [Sequenzidentität] ¹
1-3	Reamplifikation	<i>Methanoculleus</i> [100 %]	<i>M. bourgensis</i> Stamm MS2 ^T [100 %]
	Reamplifikation	<i>Methanosarcina</i> [100 %]	<i>M. thermophila</i> Stamm TM-1; <i>M. barkeri</i> Stämme Wiesmoor, Fusaro, CM1, MS, 227, 3; <i>M. mazei</i> Stämme WWM610, S-6, SarPi, C16, LYC, Goe1; <i>M. sicilae</i> Stämme C2J, T4/M; <i>M. horonobensis</i> Stamm HB-1; <i>M. lacustris</i> Stamm Z-7289 [je 99 %]
	Klonbank (Klon 37)	<i>Methanosarcina</i> [100 %]	<i>M. thermophila</i> Stamm TM-1; <i>M. barkeri</i> Stämme Wiesmoor, Fusaro, CM1, MS, 227; <i>M. sicilae</i> Stamm C2J; <i>M. horonobensis</i> Stamm HB-1 [je 99 %]
4-6, 8-10	Klonbank (Klon 47)	<i>Methanosarcina</i> [100 %]	<i>M. thermophila</i> Stamm TM-1; <i>M. barkeri</i> Stämme Wiesmoor, Fusaro [je 99 %]
	Klonbank (Klon 58)	<i>Methanosarcina</i> [100 %]	<i>M. thermophila</i> Stamm TM-1; <i>M. barkeri</i> Stämme Wiesmoor, Fusaro [je 99 %]
	Klonbank (Klon 49)	<i>Methanoculleus</i> [100 %]	<i>M. bourgensis</i> Stamm MS2 ^T [99 %]
7	Klonbank (Klon 38)	<i>Methanoculleus</i> [100 %]	<i>M. bourgensis</i> Stamm MS2 ^T [98 %]
	Klonbank (Klon 49)	<i>Methanoculleus</i> [100 %]	<i>M. bourgensis</i> Stamm MS2 ^T [99 %]
11	Klonbank (Klon 38)	<i>Methanoculleus</i> [100 %]	<i>M. bourgensis</i> Stamm MS2 ^T [98 %]
	Klonbank (Klon 49)	<i>Methanoculleus</i> [100 %]	<i>M. bourgensis</i> Stamm MS2 ^T [99 %]
	Klonbank (Klon 50)	<i>Methanoculleus</i> [100 %]	<i>M. bourgensis</i> Stamm MS2 ^T [98 %]

Tabelle 31 (Fortsetzung): Taxonomische Zuordnung der Archaea-DGGE-Signale aus Anlage A.

Signal	Identifikation durch	Klassifikation nach RDP [Konfidenz]	Nächster Verwandte nach NCBI [Sequenzidentität] ¹
13	Klonbank (Klon 50)	<i>Methanoculleus</i> [100 %]	<i>M. bourgensis</i> Stamm MS2 ^T [98 %]
14	Klonbank (Klon 38)	<i>Methanoculleus</i> [100 %]	<i>M. bourgensis</i> Stamm MS2 ^T [98 %]
	Klonbank (Klon 43)	<i>Methanoculleus</i> [100%]	<i>M. bourgensis</i> Stamm MS2 ^T [98 %]
		<i>Methano-microbiales</i> [100%]	
	Klonbank (Klon 44)	<i>Methano-microbiaceae</i> [81%]	<i>Methanosphaerula palustris</i> Stamm E1-9c [94 %] ²
*			
	Klonbank (Klon 48)	<i>Methanosarcina</i> [100%]	<i>M. thermophila</i> Stamm TM1; <i>M. barkeri</i> Stämme Wiesmoor, Fusaro, CM1, MS, 227; <i>M. sicilae</i> Stamm C2J; <i>M. horonobensis</i> Stamm HB-1 [je 99 %]
	Klonbank (Klon 59)	<i>Methanoculleus</i> [100%]	<i>M. bourgensis</i> Stamm MS2 ^T [99 %]

Die Nummerierungen der DGGE-Signale sind der Abbildung 14 zu entnehmen.

*Diese Klone stimmen mit keinem DGGE-Signal überein.

¹Es wurden nur Organismen einbezogen, deren gesamte Genom-Sequenz bekannt ist.

Wie bereits im Kapitel 3.1.2 dargestellt, repräsentiert dabei nicht jedes Signal einen einzelnen Organismus. So konnte durch Reamplifikation gezeigt werden, dass alle Signale, die dem Genus *Methanosarcina* zugeordnet werden konnten, auf lediglich eine Sequenz zurückzuführen sind (Tabelle 31). Dagegen konnten vier verschiedene Sequenzen ermittelt werden, die 98-100 % Sequenzidentität mit *Methanoculleus bourgensis* MS2^T aufwiesen, sich aber in der DGGE zum Teil überlagerten. Weitere Klone, die keinem Signal im DGGE-Profil zugeordnet werden konnten, repräsentierten ebenfalls die Genera *Methanoculleus* und *Methanosarcina*. Die archaeelle Population scheint demnach auf nur wenige Taxa limitiert zu sein und war im Verlauf der Untersuchung relativ stabil. Dennoch konnten im zeitlichen Verlauf Variationen im DGGE-Profil der einzelnen Proben detektiert werden. Während zwischen März und November 2013, sowie von September 2014 bis April 2015 sowohl *Methanosarcina*-, als auch *Methanoculleus*-spezifische Signale zu detektieren waren, fehlten die *Methanosarcina*-spezifischen Signale zwischen Januar und August 2014. Zusätzlich konnten zwischen April und August 2014 neben den typischen DGGE-Signalen, die auch in den übrigen Proben zu sehen sind, einige weitere Signale detektiert werden (Abbildung 14,

Pfeile). Die entsprechenden 16S-Fragmente konnten jedoch nicht identifiziert werden, da eine Reamplifikation der DNA dieser Signale nicht möglich war.

Mit Hilfe der allgemeinen Archaea-DGGE konnten Vertreter der *Methanomicrobiales* und *Methanosarcinales* in Anlage A nachgewiesen werden. Vertreter der *Methanobacteriales* und *Methanococcales* waren jedoch nicht detektierbar. Da bekannt ist, dass Organismengruppen, die nur in geringer Abundanz vorkommen, mit Hilfe universeller (Phylum-spezifischer) *Primer* in der DGGE nicht ausreichend visualisierbar sind (177), wurden die Proben zusätzlich mit spezifischen *Primer*-Paaren für die Ordnungen *Methanobacteriales* und *Methanococcales* untersucht (siehe Tabelle 8).

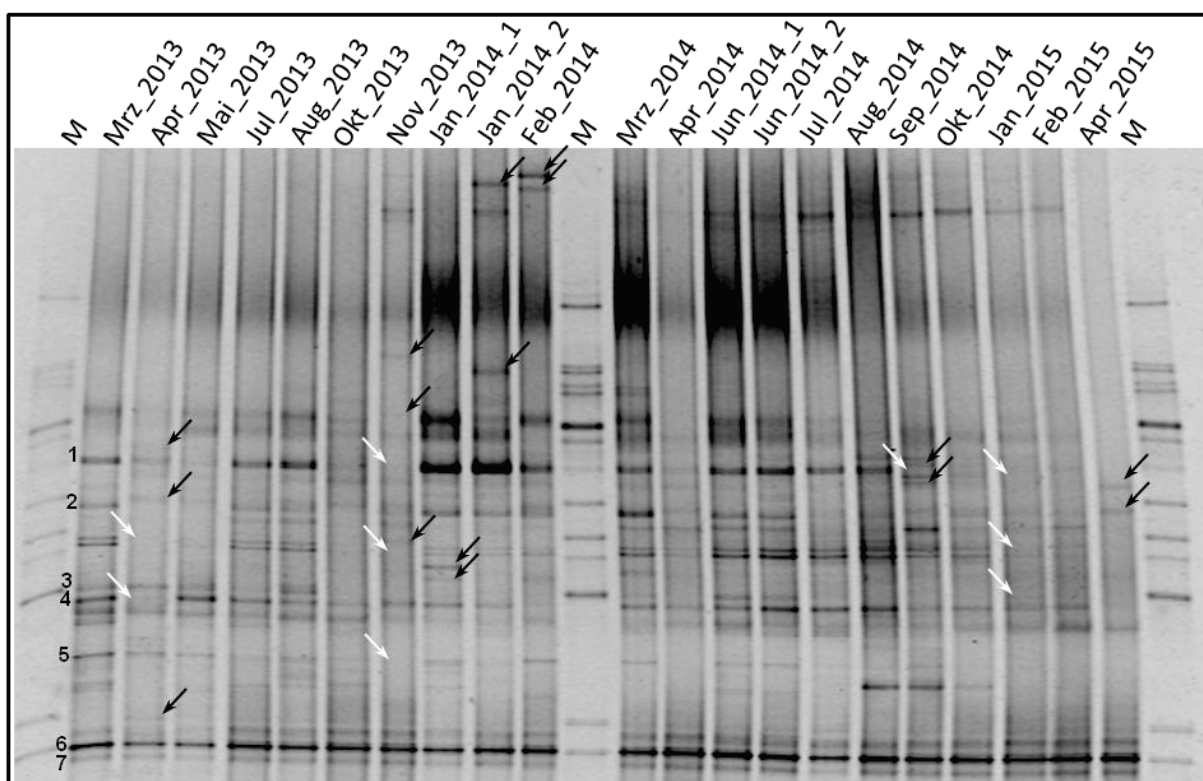


Abbildung 15: Visualisierung der *Methanobacteriales* in Anlage A mittels DGGE.

Nach Amplifikation mit Hilfe der *Primer* Mbt857f_GC und Mbt1196r wurden die DNA-Fragmente im 40-70 % igen denaturierenden Gradienten aufgetrennt. Nummerierte Signale konnten durch Abgleich mit einer entsprechenden Klonbank identifiziert werden. Schwarze Pfeile: Hinzukommende Signale, weiße Pfeile: Fehlende Signale, M: Marker.

In den Proben konnten mittels PCR keine *Methanococcales* nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). *Methanobacteriales* konnten hingegen detektiert und anschließend mit Hilfe der DGGE differenziert werden. Die einzelnen DGGE-Profile der Proben von Januar bis August 2014 zeichneten sich durch das Auftreten der gleichen charakteristischen Hauptsignale aus, sodass sehr ähnliche DGGE-Muster entstanden. Ähnlich wie auch bei der allgemeinen Archaea-DGGE scheint also die Zusammensetzung der *Methanobacteriales* in diesem Zeitraum sehr ähnlich zu sein. Lediglich im Januar und Februar wurden vereinzelt zusätzliche Signale detektiert (Abbildung 15, schwarze Pfeile).

Auch die Proben aus dem Jahr 2013 waren zu denen von 2014 relativ ähnlich. Allerdings waren hier stärkere Variationen zu beobachten. Insbesondere im April und November 2013 fehlten einige Signale (Abbildung 15, weiße Pfeile), während andere hinzu kamen (Abbildung 15, schwarze Pfeile). Ab September 2014 veränderte sich das DGGE-Profil der einzelnen Proben deutlich. Während im September 2014 noch einzelne Signale hinzukamen, waren vor allem die Proben aus dem Jahr 2015 durch das Fehlen vieler Signale geprägt.

Zusätzlich wurde auch eine für die Ordnung *Methanobacteriales* spezifische Klonbank der Anlage A erstellt, mit deren Hilfe prominente Signale des charakteristischen DGGE-Musters phylogenetisch eingeordnet werden konnten. Allerdings waren nur zwei der DGGE-Signale (1 und 2) eindeutig klassifizierbar und wiesen 99 % Sequenzidentität mit *Methanobacterium* Stamm MB1 auf (Tabelle 32). Diese konnten sehr konstant in Anlage A detektiert werden. Lediglich ab September 2014 fehlten die Signale 1 und 2. Die übrigen zu DGGE-Signalen gehörigen Klone wiesen nur 95-96 % Sequenzidentität zu bisher beschriebenen Arten, wie verschiedenen *Methanospaera*- und *Methanobacterium*-Stämmen oder *Methanobrevibacter ruminantium*, auf und scheinen daher bisher noch unbekannte Arten zu repräsentieren. Weitere analysierte Klone, die jedoch nicht mit sichtbaren Signalen der DGGE korrespondieren, wurden den Gattungen *Methanobrevibacter* (Klone 5 und 16) oder *Methanobacterium* (Klone 6, 12 und 28) zugeordnet. Die Klone 7 und 18 waren ebenfalls nicht eindeutig taxonomisch klassifizierbar. Auffällig war außerdem, dass die nicht eindeutig phylogenetisch zuzuordnenden Sequenzen eine hohe Sequenzähnlichkeit von 99 % zu anderen, bisher nicht kultivierten Archaeen hatten, die im Rumen von z. B. Schafen und Rindern nachgewiesen wurden (135).

Tabelle 32: Taxonomische Einordnung *Methanobacteriales*-spezifischer DGGE Signale und zusätzlicher Klone.

Signal	Identifikation durch	Klassifikation nach RDP [Konfidenz]	Nächster Verwandte nach NCBI [Sequenzidentität] ¹
1	Klon 25	<i>Methanobacterium</i> [100 %]	<i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1 [99 %]
2	Klon 23	<i>Methanobacterium</i> [100 %]	<i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1 [99 %]
3	Klon 19	<i>Methanobacteriaceae</i> [100%] <i>Methanobrevibacter</i> [78%]	<i>Methanospaera stadtmanae</i> DSM 3091 Stamm MCB-3 [95 %] ²
4	Klon 20	<i>Methanobacteriaceae</i> [100%] <i>Methanobrevibacter</i> [91%]	<i>Methanobacterium paludis</i> Stamm SWAN1; <i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm BRM9 [je 96 %] ²

Tabelle 32 (Fortsetzung): Taxonomische Einordnung *Methanobacteriales*-spezifischer DGGE Signale und zusätzlicher Klone.

Signal	Identifikation durch	Klassifikation nach RDP [Konfidenz]	Nächster Verwandte nach NCBI [Sequenzidentität] ¹
5	Klon 21	<i>Methanobacteriaceae</i> [100%] <i>Methanobrevibacter</i> [82%]	<i>Methanospaera stadtmanae</i> DSM 3091 Stamm MCB-3 [95 %] ²
6,7	Klon 10	<i>Methanobacteriaceae</i> [100%] <i>Methanobrevibacter</i> [79%]	<i>Methanospaera stadtmanae</i> DSM 3091; <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> Stamm M1 [je 95 %] <i>Methanospaera cuniculi</i> Stamm 1R7 [96 %] ³
*	Klon 5	<i>Methanobrevibacter</i> [99%]	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i> Stamm M1; <i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1; <i>Methanobacterium paludis</i> Stamm SWAN1 [je 97 %]
	Klon 6	<i>Methanobacterium</i> [99%]	<i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1; <i>Methanobacterium paludis</i> Stamm SWAN1 [je 98 %]
*	Klon 7	<i>Methanobacteriaceae</i> [100%] <i>Methanobacterium</i> [92%]	<i>Methanobacterium formicicum</i> Stämme BRM9, DSM 1535 [99 %]
	Klon 12	<i>Methanobacterium</i> [100%]	<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm BRM9 [99 %]
	Klon 16	<i>Methanobrevibacter</i> [100%]	<i>Methanobrevibacter smithii</i> Stämme DSM 2374, ATCC 35061 [je 98 %]
	Klon 18	<i>Methanobacteriaceae</i> [100%] <i>Methanobrevibacter</i> [84%]	<i>Methanospaera stadtmanae</i> DSM 3091; <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> Stamm M1 [je 95 %] <i>Methanospaera cuniculi</i> Stamm 1R7 [96 %] ³
	Klon 28	<i>Methanobacterium</i> [100%]	<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm BRM9; <i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1 [je 99 %]

Die Nummerierungen der DGGE-Signale sind der Abbildung 15 zu entnehmen.

*Diese Klone stimmen mit keinem DGGE-Signal überein.

¹Es wurden nur Organismen einbezogen, deren gesamte Genom-Sequenz bekannt ist.

²Durch Einbeziehen von Organismen, deren 16S rDNA Sequenz, aber nicht das Genom bekannt sind, konnte kein näher verwandter Organismus identifiziert werden.

³Identifikation lediglich durch eine bekannte 16S rDNA-Sequenz; das Genom ist derzeit noch nicht bekannt.

Zur näheren Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft in Anlage A wurden neben der Untersuchung der Diversität außerdem ausgewählte Mikroorganismengruppen mit Hilfe der qPCR

quantifiziert. Da die DGGE-Resultate auf eine Dominanz von *Methanoculleus* und *Methanosarcina* hinwiesen, wurden neben den Domänen der Bacteria und Archaea die Abundanzen dieser beiden Genera ermittelt.

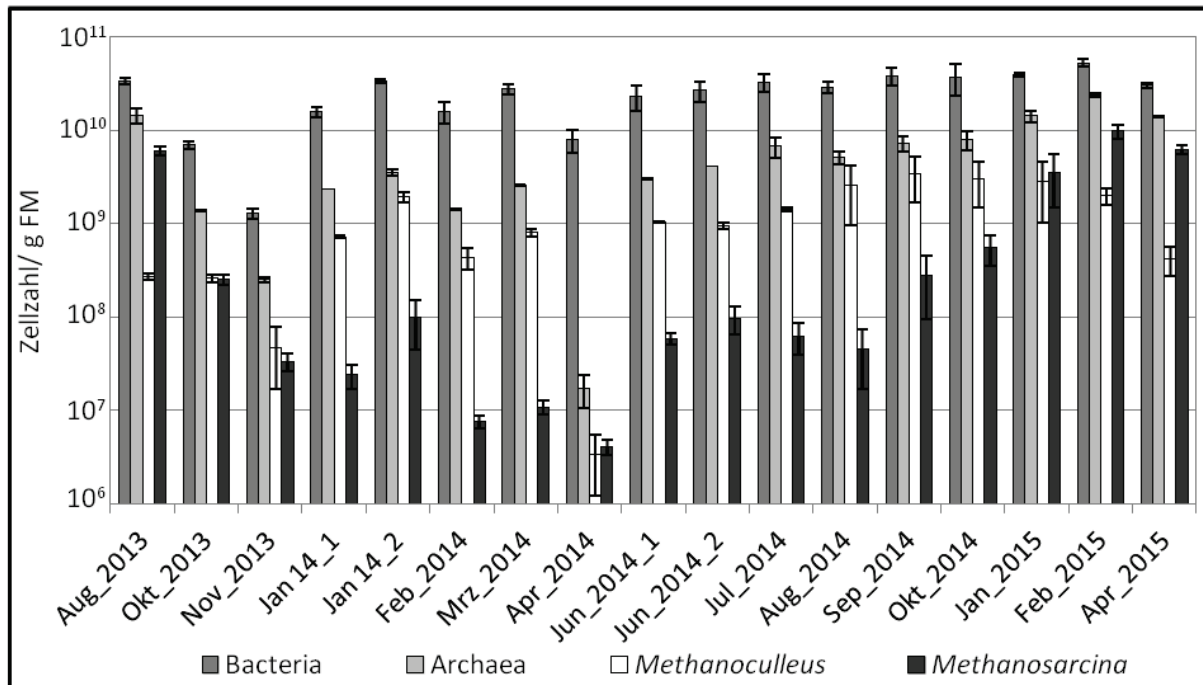


Abbildung 16: Abundanzen der Bacteria, Archaea sowie der Genera *Methanoculleus* und *Methanosarcina* in Anlage A. Mittels qPCR wurden die jeweiligen 16S-rDNA Kopienzahlen ermittelt und daraus die Zellzahlen pro g Frischmasse (FM) bestimmt. Die Standardabweichungen wurden aus mindestens sechs Replikaten errechnet.

Es wurden durchschnittlich ca. $1-3 \times 10^{10}$ Bacteria/g FM in den Proben nachgewiesen (Abbildung 16). Diese Abundanzen stimmen mit den mikroskopisch bestimmten Gesamtzellzahlen von durchschnittlich ca. $2-5 \times 10^{10}$ Zellen/g FM überein. Die Zellzahl der Archaea war im Jahr 2014 relativ konstant zwischen $1,4 \times 10^9 \pm 3,4 \times 10^7$ (Februar 2014) und $8 \times 10^9 \pm 1,9 \times 10^9$ Zellen/g FM (Oktober 2014) und stieg im Jahr 2015 auf bis zu $2,4 \times 10^{10} \pm 1,4 \times 10^9$ Zellen/g FM an (Februar 2015). Daraus leitet sich ein Bacteria:Archaea Verhältnis von 5:1 bis 11:1 im Jahr 2014 bzw. 2:1 bis 3:1 im Jahr 2015 ab. Innerhalb der zwei Jahre, in denen die Anlage A beprobt wurde, konnten zwei Rückgänge in den mikrobiellen Abundanzen detektiert werden. Zum einen sank im Vergleich zum Vormonat die Zahl der Bacteria im Oktober/November 2013 leicht auf $1,3 \times 10^9 \pm 1,6 \times 10^8$ Zellen pro g FM und die Zahl der Archaea auf $2,5 \times 10^8 \pm 1,9 \times 10^7$ Zellen/g FM ab. Allerdings blieb das Verhältnis zwischen Bacteria und Archaea bei ca. 5:1. Ein zweier Rückgang der mikrobiellen Zellzahlen wurde im April 2014 detektiert. Während hier die Zahl der Bacteria im Vergleich zum Vormonat nur leicht auf $7,9 \times 10^9 \pm 2,2 \times 10^9$ Zellen/g FM sank, wurde ein dramatischer Rückgang der Archaea um zwei Größenordnungen auf $1,7 \times 10^7 \pm 6,7 \times 10^6$ Zellen/g FM beobachtet. Die Zellzahlen von Mikroorganismen des Genus *Methanoculleus* lagen zwischen Januar und Oktober 2014 mit

$4,3 \times 10^8 \pm 1,2 \times 10^8$ (Februar 2014) bis $3,3 \times 10^9 \pm 1,8 \times 10^9$ (September 2014) Zellen/g FM etwa eine Größenordnung höher, als die von *Methanosarcina* ($7,6 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^6$ Zellen/g FM im Februar 2014 bis $5,5 \times 10^8 \pm 2 \times 10^8$ Zellen/g FM im Oktober 2014). Im Gegensatz dazu waren die Zellzahlen der *Methanosarcina* sowohl 2013 als auch 2015 gleich oder sogar größer als die von *Methanoculleus*, was die Ergebnisse der DGGE (siehe Abbildung 14) bestätigt. Anhand der qPCR Daten lässt sich ein leichter Störfall im Oktober/November 2013 sowie ein schwerer Störfall im April 2014 postulieren. Der Rückgang der archaeellen Abundanzen im Oktober/November 2013 wurde von einem Anstieg des Ammonium-Stickstoffes auf 5,8 g/l und der flüchtigen organischen Säuren (FOS) auf 7,2 g Essigsäureäquivalente/l (Abbildung 17) begleitet, wobei insbesondere die Essigsäure zu nennen ist (Daten nicht gezeigt). Ebenso konnte ein dramatischer Anstieg des Sulfat-Schwefels um mehr als das 8-fache auf bis zu 79,4 mg/l gemessen werden. Ab Januar 2014 gingen sowohl die Konzentration der FOS sowie des Ammonium-Stickstoffes als auch des Sulfat-Schwefels wieder zurück. Diese Veränderungen der chemischen Parameter liegt möglicherweise in einem erhöhten Anteil der organischen Trockensubstanz (oTS) begründet, der mit 105 g/kg im Oktober 2013 sein Maximum erreichte. Bis April 2014 sank die oTS auf nur 66,7 g/kg, was ursächlich für den zweiten Störfall sein könnte. Im weiteren Verlauf der Beprobung blieb der oTS-Wert im Bereich von 60-80 g/kg. Die Zusammensetzung der mikrobiellen Population konnte sich nach beiden Prozessstörungen wieder normalisieren, was sowohl durch den Anstieg der Abundanzen auf die durchschnittlichen Zellzahlen, aber auch an der Rückkehr zum charakteristischen DGGE-Profil (siehe Abbildung 14) zu erkennen ist. Auf Grundlage dieser Daten konnte mit Hilfe der Spearmanschen Rangkorrelationsanalyse eine negative Korrelation der Abundanz der Archaea mit der FOS-Konzentration ($\rho=-0,60$; $p=0,012$), der Ammonium-Stickstoff-Konzentration ($\rho=-0,59$; $p=0,014$) und der oTS ($\rho=-0,52$; $p=0,036$) nachgewiesen werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass im April 2014 der Rückgang der archaeellen Abundanz nicht, wie diese negative Korrelation suggeriert, durch einen Anstieg in der FOS-, Ammonium-Stickstoff- oder oTS-Konzentration begründet ist. Es konnte des Weiteren eine negative Korrelation der *Methanoculleus*-Abundanz mit der Ammonium-Stickstoff-Konzentration ($\rho=-0,56$; $p=0,022$) gezeigt werden. Eine statistisch signifikante Korrelation der *Methanoculleus*-Abundanz mit der FOS-Konzentration oder der oTS, sowie der *Methanosarcina*-Abundanz mit einem der dargestellten chemischen Parameter konnte nicht nachgewiesen werden.

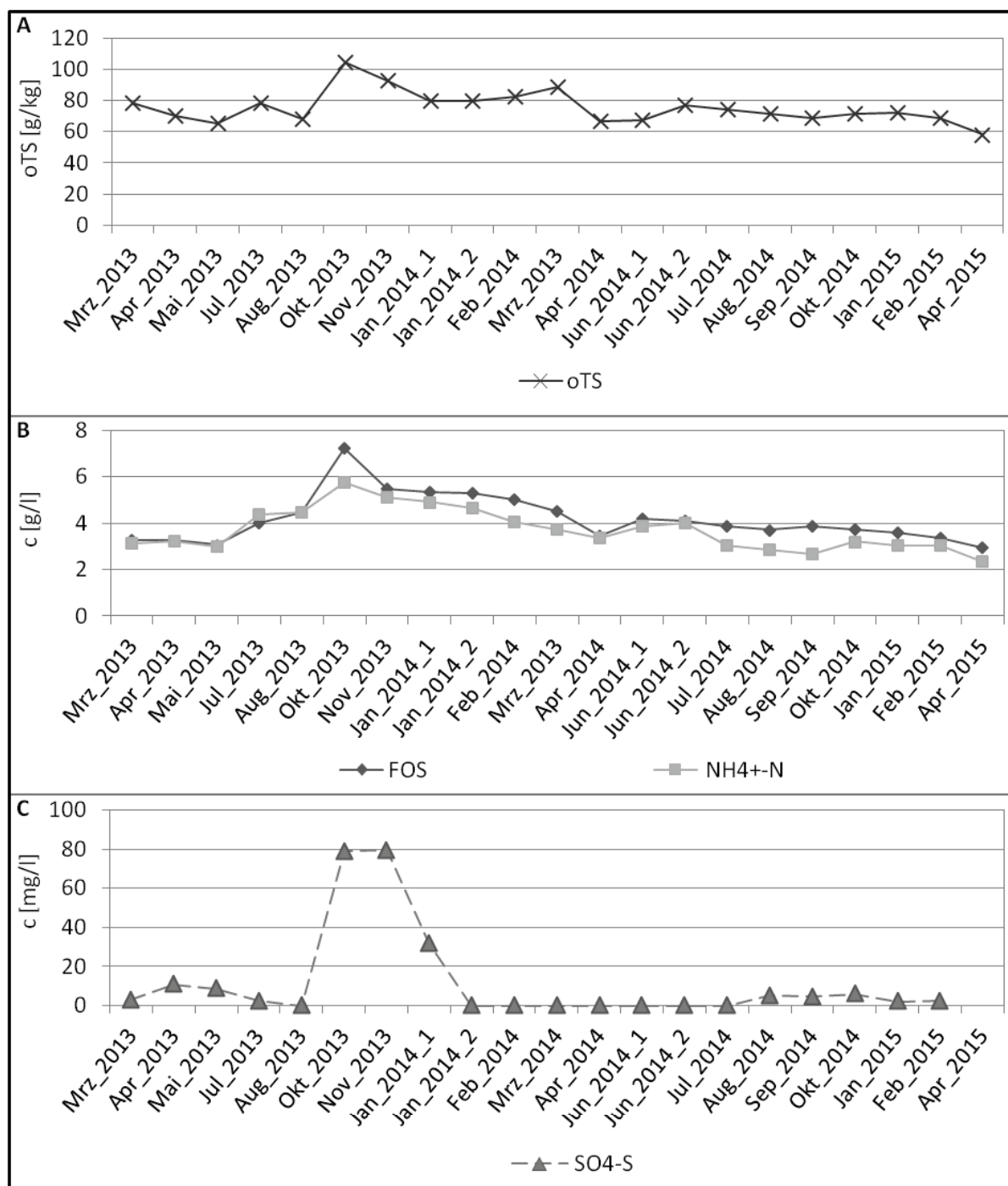


Abbildung 17: Konzentrationen der flüchtigen organische Säuren, des Ammonium-Stickstoffes und des Sulfat-Schwefels sowie die oTS in Anlage A.

Die organische Trockensubstanz (oTS) (A) sowie die flüchtigen organischen Säuren (FOS) und der Ammonium-Stickstoff (NH₄⁺-N) (B) wurden durch Bioreact/Bonalytic (Troisdorf, DEU) bestimmt und zur Verfügung gestellt. Die Konzentration der flüchtigen organischen Säuren bezieht sich dabei auf das g Essigsäureäquivalente pro l. Die Bestimmung des Sulfat-Schwefels (SO₄-S) (C) erfolgte durch Herrn Heiko Herrling (Technische Universität Dresden, DEU).

Um die Ergebnisse der qPCR zu verifizieren, wurden zusätzlich die relativen Abundanzen von Bacteria, Archaea und *Methanosarcina* mit Hilfe spezifischer Oligonukleotidsonden durch CARD-FISH bestimmt.

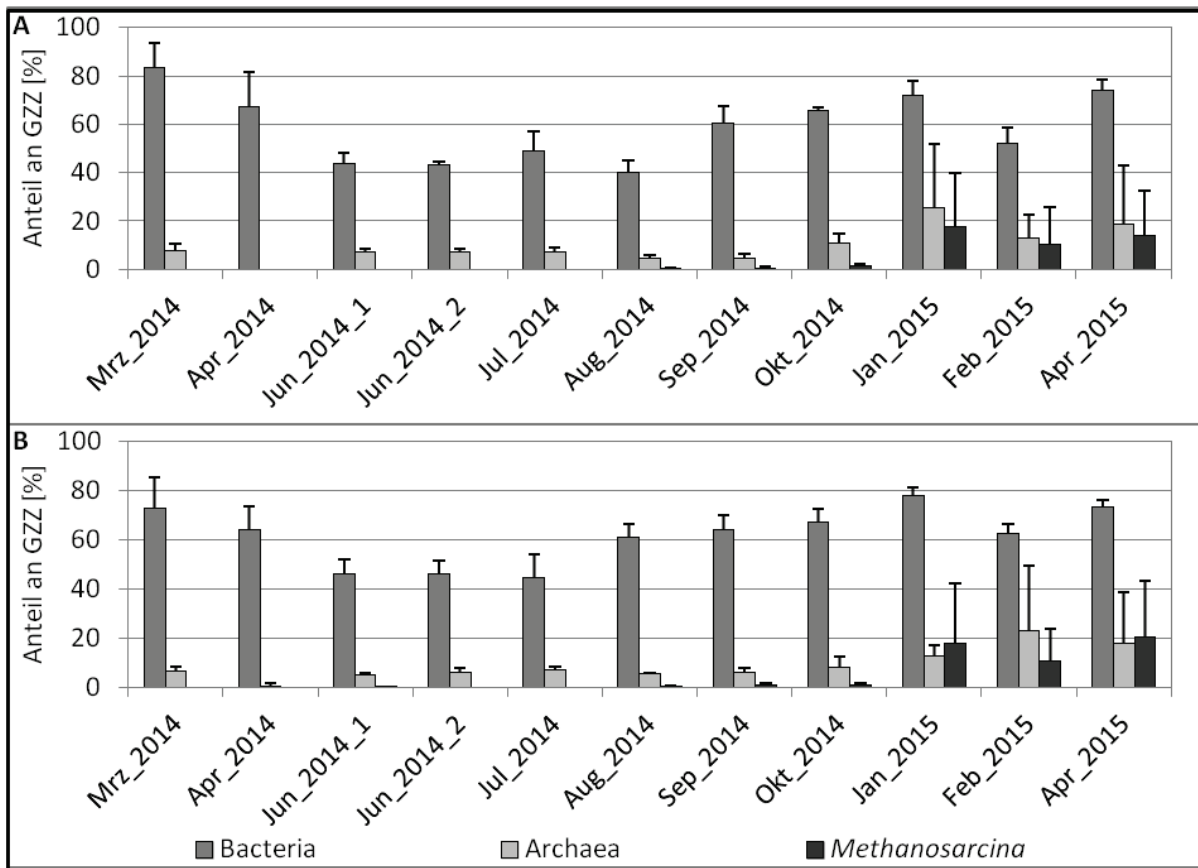


Abbildung 18: Mittels CARD-FISH bestimmte relative Abundanzen der Bacteria, Archaea und *Methanosarcinales* in Anlage A.

Die mit Pectinex (A) und Tween80 (B) vorbehandelten Proben wurden mit Hilfe eines optimierten CARD-FISH-Protokolls mit den Sonden EUB I-III (Bacteria), A915 (Archaea) und MSMX860 (*Methanosarcinales*) hybridisiert. Die Standardabweichungen wurden aus mindestens fünf Einzelzählungen von insgesamt mindestens 400 Zellen (Bacteria und Archaea) bzw. mindestens zehn Einzelzählungen (*Methanosarcinales*) berechnet.

Dabei wurden in Übereinstimmung mit den Resultaten der qPCR im Jahr 2014 Bacteria:Archaea Verhältnisse zwischen 6:1 und 13:1 (Pectinex) bzw. zwischen 6:1 und 11:1 (Tween80) ermittelt. Im Jahr 2015 stiegen die relativen Abundanzen der Archaea an, was zu einem erhöhten Bacteria:Archaea Verhältnis von 3:1 bis 4:10 (Pectinex und Tween80) führte. Lediglich in der Probe vom April 2014 konnten keine Archaea hybridisiert werden, sodass auch die Resultate der CARD-FISH den in diesem Monat den anhand der qPCR-Daten postulierten Störfall widerspiegeln. Die Proben zwischen Juni und August 2014 waren insgesamt durch eine sehr schlechte Hybridisierbarkeit von z. T. unter 50 % der Gesamtzellzahl geprägt (Abbildung 18). In diesem Proben erschwerte zusätzlich ein starker unspezifischer Hintergrund die mikroskopische Auswertung. Der in der DGGE und qPCR bereits beobachtete Anstieg der *Methanosarcina* konnte auch in der CARD-FISH mit Hilfe der Sonde MSMX860 (spezifisch für *Methanosarcinales*) gezeigt werden. Die dabei hybridisierten Zellen zeichneten sich alle durch die für die Gattung *Methanosarcina* charakteristische Clusterbildung („Sarcinen“) aus (Abbildung 19). Demnach sind seit Januar 2015 Organismen der Gattung *Methanosarcina* die häufigsten Archaeen in Anlage A. Die erschwerte Auszählung der

dreidimensionalen Sarcinen begründet auch die hohe Standardabweichung in den Zählungen der Archaea und *Methanosarcinales* in diesen Monaten.

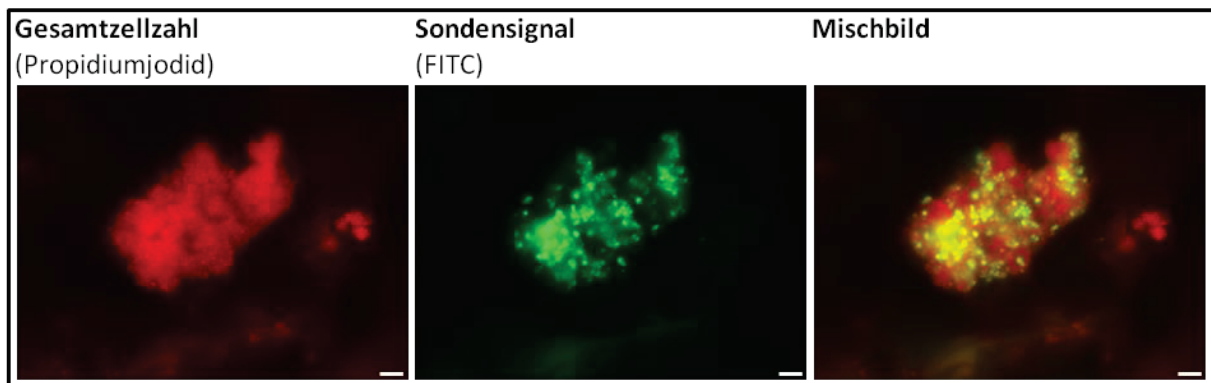


Abbildung 19: Mittels CARD-FISH visualisierte Methanosarcinen.

Unter Verwendung der Sonde MSMX860 konnten mit Hilfe der CARD-FISH Organismen der Ordnung *Methanosarcinales* hybridisiert werden. Die angegebene Größenskala entspricht 5 µm.

Die Resultate der DGGE, qPCR und CARD-FISH zeigen übereinstimmend einen Rückgang der Methanosarcinen im Jahr 2014 und gleichzeitig eine Dominanz von *Methanoculleus* in diesem Zeitraum. Im Gegensatz dazu war das Verhältnis von *Methanoculleus* und *Methanosarcina* in den Jahren 2013 und 2015 ausgewogen. Diese Variabilität der archaeellen Population ergab sich möglicherweise aus dem Fütterungsprofil der Anlage A (Abbildung 20, Tabelle 3). Während der Anteil der Maissilage an der Gesamtfütterungsmenge konstant blieb, erhöhte sich der Anteil von Hühnertrockenkot von 12-15 % im Jahr 2013 auf 21-27 % zwischen Januar und August 2014. Gleichzeitig verringerte sich der Anteil von Rindermist von 17-19 % im Jahr 2013 auf nur 5-11 % zwischen Januar und Juli 2014. Im Oktober 2014 wurde das Fütterungsprofil erneut verändert und der Anteil von Hühnertrockenkot wieder auf 10-15 % verringert sowie der Anteil von Rindermist wieder auf 17-22 % erhöht. Die Veränderung der Fütterung spiegelte sich nicht in den untersuchten chemischen Parametern wieder (Daten nicht gezeigt). Lediglich die Konzentration des gelösten Eisens (beinhaltet sowohl Fe-(II)- als auch Fe-(III)-Ionen) schien ebenfalls durch die Fütterung beeinflusst zu sein und war im Jahr 2014 geringer als in 2013 und 2015 (Abbildung 21). Dennoch konnte nur eine geringe positive Korrelation der Abundanz der Methanosarcinen mit dem gelösten Eisen nachgewiesen werden (Spearmanischer Rangkorrelationskoeffizient 0,4 mit einem Signifikanzniveau von 0,08).

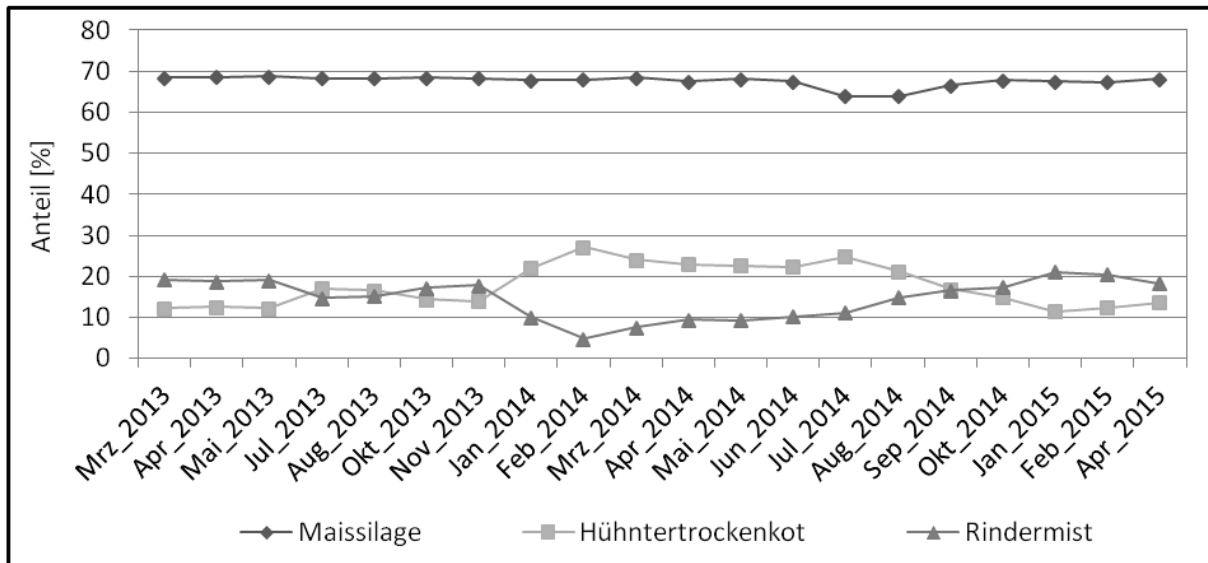


Abbildung 20: Fütterungsprofil der Anlage A.

Dargestellt ist jeweils der Anteil von Maissilage, Hühnertrockenkot und Rindermist an der Gesamtfütterungsmenge in %. Die Daten zur Fütterung wurden von Bioreact/Bonalytic (Troisdorf, D) zur Verfügung gestellt.

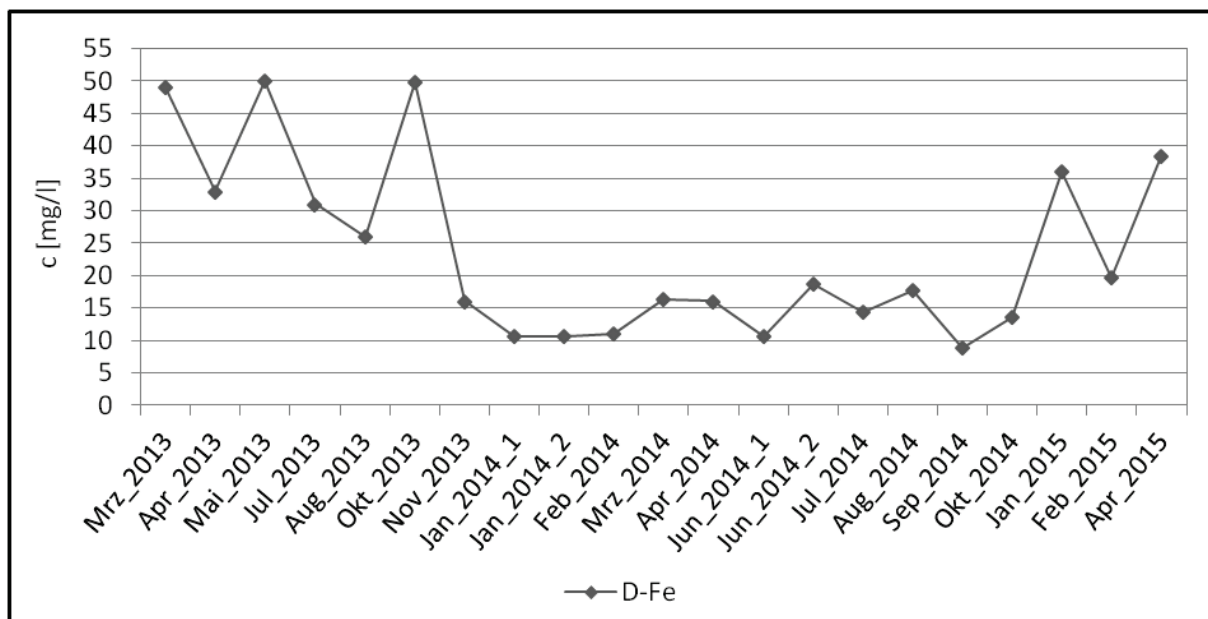


Abbildung 21: Konzentration des gelösten Eisens in Anlage A.

Die Konzentration des gelösten Eisens (D-Fe) durch Herrn Heiko Herrling (Technische Universität Dresden, DEU) bestimmt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Um auch weniger abundante Mikroorganismen zu erfassen, wurde zusätzlich mit Hilfe der 454-Amplikonsequenzierung die Probe vom Februar 2015 untersucht.

Tabelle 33: Durch Archaea-spezifische 454-Amplikonsequenzierung erfasste Anzahl der Sequenzen und OTUs sowie Diversitätsindices der Anlage A.

	Anzahl Sequenzen	Abdeckung („coverage“) [%]	Anzahl OTUs	inverser Simpson- Index	Chao1 (Konfidenz- Intervall)	ACE (Konfidenz- Intervall)
Feb_2015	7871	99,7	31	1,2	108 (55-278)	125 (60-333)

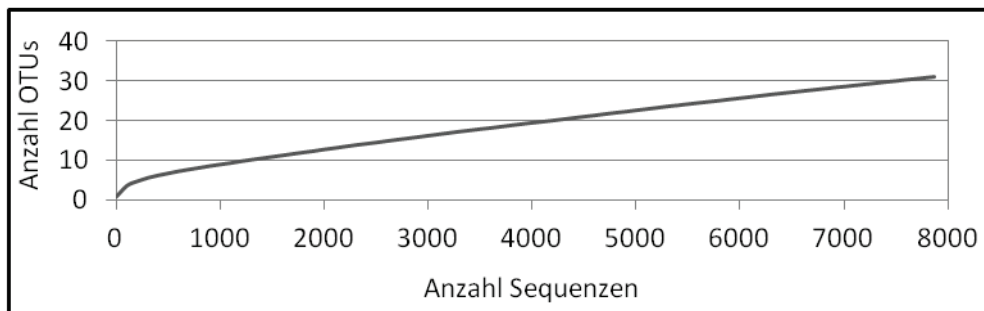


Abbildung 22: Aus der Archaea-spezifischen 454-Amplikonsequenzierung resultierende *rarefaction*-Kurve der Anlage A. Die *rarefaction*-Kurve wurde aus der Anzahl der OTUs mit einer Sequenz-Dissimilarität von ≤ 3 % pro Anzahl der Sequenzen berechnet.

Nachdem die erhaltenen Sequenzen nach den entsprechenden Qualitätskriterien (siehe 2.3.8) gefiltert wurden, konnten die verbleibenden 7871 Sequenzen 31 „operational taxonomic units“ (OTUs) zugeordnet werden, was einer Abdeckung von 99,7 % entspricht (Tabelle 33). Die *rarefaction*-Kurve zeigte bereits nach weniger als 500 untersuchten Sequenzen einen abflachenden Anstieg (Abbildung 22). Lediglich der Chao1- und ACE-Index deutete jeweils auf eine etwas höhere theoretische Anzahl von OTUs in der Probe hin, als tatsächlich gefunden wurden. Anhand der Diversitätsparameter und der *rarefaction*-Kurve kann davon ausgegangen werden, dass Diversität in der Probe gut durch die detektierten Sequenzen abgedeckt wird.

Alle Sequenzen (ausgenommen einer nicht klassifizierbaren) wurden dem Phylum der *Euryarchaeota* zugeordnet. Die taxonomische Zuordnung sowohl mit RDP als auch mit Silva führte zu gleichen Ergebnissen, sodass im Folgenden nur auf die Klassifizierung nach RDP eingegangen wird. Wie durch die bisher gezeigten Ergebnisse bereits dargestellt, zeigte sich auch in der 454-Amplikonsequenzierung eine sehr limitierte archaeelle Diversität. In Übereinstimmung mit der qPCR konnte *Methanosarcina* mit ≈ 93 % aller Sequenzen als dominierender Genus im Februar 2015 identifiziert werden (Abbildung 23). Daneben konnten nur drei weitere Genera in der Probe detektiert werden. Als zweithäufigster Genus wurde *Methanoculleus* mit ≈ 5 % aller Sequenzen identifiziert. *Metanomassiliicoccus* sowie *Methanobacterium* waren mit weniger als 1 % der gesamten Sequenzen nur in vernachlässigbarer Zahl vorhanden.

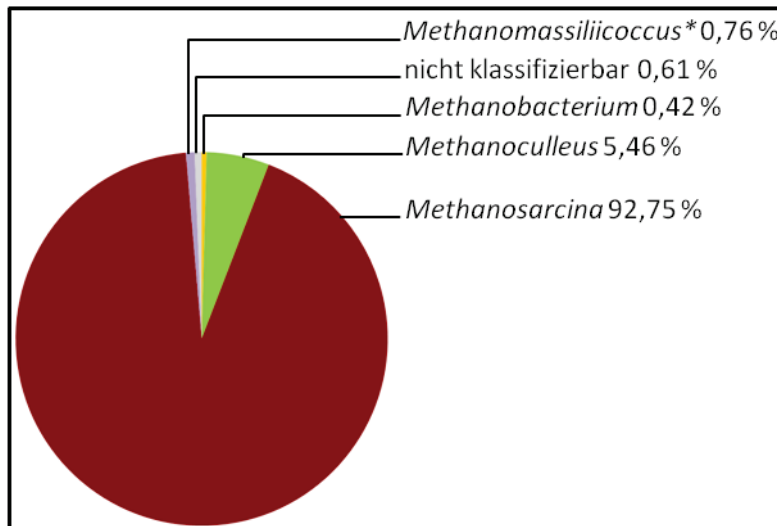


Abbildung 23: Durch Archaea-spezifische 454-Amplikonsequenzierung bestimmte relative Abundanzen der einzelnen Genera in Anlage A.

Dargestellt sind die Anteile der mittels RDP-Taxonomie klassifizierten Sequenzen an der Gesamt-Anzahl der Sequenzen auf Genus-Ebene. *: Aufgrund der höheren Konfidenz erfolgte die Zuordnung mit Hilfe des RDP-Classfier

3.2.1.2 Simulation von Prozessstörungen

Um einen reibungslosen Betrieb von Biogasanlagen zu gewährleisten, ist es hilfreich, die mikrobiologischen Prozesse sowie die dafür verantwortlichen Organismen zu kennen und Betriebsparameter entsprechend der Bedürfnisse der mikrobiellen Population anzupassen. Trotz optimierter Bedingungen und genauer Überwachung der Biogasanlagen kann es jedoch immer wieder zu Störfällen kommen, die z. T. einen erheblichen Einfluss auf die Biogasproduktion haben. Um derartige Prozessstörungen zu vermeiden, ist es von grundlegender Bedeutung, die mikrobiellen Abläufe während eines Störfalles aufzuklären. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Hemmung der Methanbildung durch Ammonium-Intoxikation sowie Versauerung im Labormaßstab untersucht. Dafür wurde als Substrat Fermentermaterial aus Anlage A verwendet. Die Ammonium-Intoxikation sollte dabei durch Zugabe von Harnstoff und die Versauerung durch Zugabe verschiedener leicht vergärbare Substrate simuliert werden.

Die Dynamik der archaeellen Population im Verlauf dieser Störungen wurde im Anschluss mit Hilfe der DGGE visualisiert und mit dem charakteristischen DGGE-Profil der Anlage A verglichen (Abbildung 24). Die archaeelle Biozönose der Kontrollen spiegelt dabei erwartungsgemäß die der Anlage A wieder. Da für den jeweiligen ersten Hemmversuch das Substrat im Jahr 2014 entnommen wurde, waren die DGGE-Profile dieser Proben vergleichbar mit dem der Anlage A im August 2014 (Abbildung 24, „Aug_2014“) und es waren insbesondere *Methanoculleus*-spezifische DGGE-Signale detektierbar (vergleiche Abbildung 14). Im Gegensatz dazu sind im jeweiligen zweiten Hemmversuch, für den das Material im Januar 2015 entnommen wurde, sowohl *Methanoculleus*-, als auch *Methanosarcina*-spezifische Signale zu finden (vergleiche Abbildung 14) und die entsprechenden DGGE-Profile glichen dem aus Anlage A im Februar 2015 (Abbildung 24, „Feb_2015“).

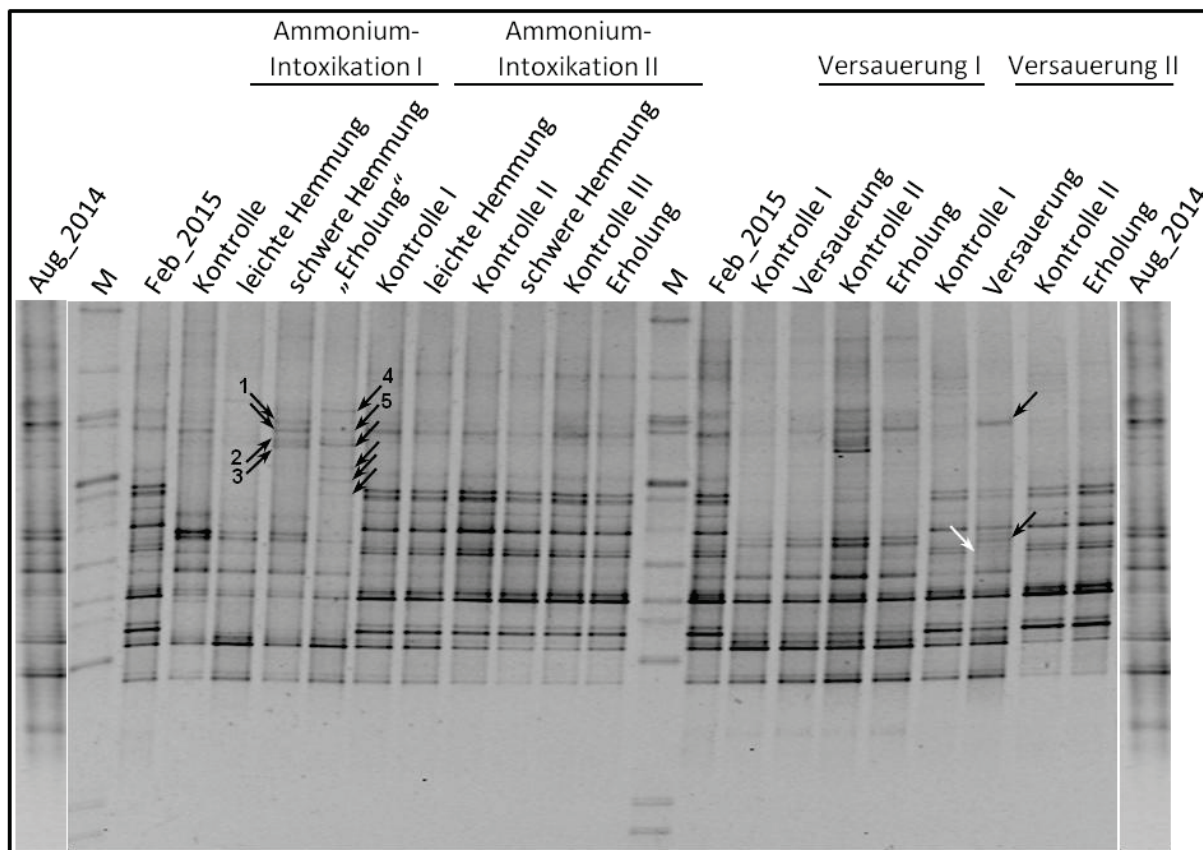


Abbildung 24: Mittels DGGE visualisierte archaeelle Diversität im Verlauf von Prozessstörungen.

Mit Hilfe der Primer Parch340f und A915r_GC wurden archaeelle 16S rDNA Fragmente generiert und elektrophoretisch in einem 40-70 % denaturierenden Gradienten aufgetrennt. Vergleichend sind die Proben Aug_2014 und Feb_2015 aus Anlage A dargestellt. Durch Sequenzierung von reamplifizierten Signalen konnten die nummerierten Signale identifiziert werden. Schwarze Pfeile markieren hinzukommende und weiße Pfeile fehlende Signale im DGGE-Profil. M: Marker.

Im Rahmen des ersten Versuches zur Ammonium-Intoxikation konnten mit Hilfe der DGGE einige Veränderungen im Signalprofil detektiert werden (Abbildung 24). So wurde die Signalintensität der charakteristischen Signale mit zunehmender Ammoniumkonzentration immer schwächer, während in den Proben der schweren Hemmung und „Erholung“ einige Signale hinzukamen. Die Signale 1 bis 5 konnten dabei durch Reamplifikation phylogenetisch eingeordnet werden (Tabelle 34). Die Signale 1 und 3 waren dabei eindeutig dem Genus *Methanoculleus* zuzuordnen und zeigten, wie auch die typischen Signale von Anlage A, am meisten Ähnlichkeit zu *Methanoculleus bourgensis* Stamm MS2^T. Die Signale 2 und 4 waren nicht eindeutig klassifizierbar und wiesen nur Sequenzähnlichkeiten von < 97 % mit *Methanoculleus bourgensis* Stamm MS2^T auf. Allerdings war die Sequenz des Signals 4 bereits aus anderen Studien bekannt, in denen die archaeelle Population in Biogasanlagen erfasst wurde. Bei Signal 2 hingegen war auch die Sequenzähnlichkeit zu unkultivierten Archaea aus Biogasanlagen < 90 %, sodass hier von einer neuen, ammoniumtoleranten Art ausgegangen werden kann. Das Signal 5 konnte dem Genus *Methanosarcina* zugeordnet werden.

Tabelle 34: Taxonomische Zuordnung spezifischer DGGE-Signale nach Ammonium-Intoxikation durch Reamplifikation.

Signal	Klassifikation nach RDP [Konfidenz]	Nächster Verwandte nach NCBI [Sequenzidentität]
1	<i>Methanoculleus</i> [100 %]	<i>Methanoculleus bourgensis</i> Stamm MS2 ^T [99 %] ¹
2	<i>Methanomicrobia</i> [99 %]	<i>Methanoculleus marisnigri</i> Stamm JR1 [86 %] ¹
	<i>Methanomicrobiales</i> [96 %]	<i>Methanoculleus palmolei</i> Stamm DSM4273 [89 %] ³
3	<i>Methanoculleus</i> [98 %]	<i>Methanoculleus bourgensis</i> Stamm MS2 ^T [98 %] ¹
4	<i>Methanomicrobiaceae</i> [100 %]	<i>Methanoculleus bourgensis</i> Stamm MS2 ^T [95 %] ²
	<i>Methanoculleus</i> [86 %]	
5	<i>Methanosarcina</i> [97 %]	<i>Methanosarcina thermophila</i> TM-1 [95 %] ²

Die Nummerierungen der DGGE-Signale sind der Abbildung 24 zu entnehmen.

¹Es wurden nur Organismen einbezogen, deren gesamte Genom-Sequenz bekannt ist.

²Durch Einbeziehen von Organismen, deren 16S rDNA Sequenz, aber nicht das Genom bekannt sind, konnte kein näher verwandter Organismus identifiziert werden.

³Identifikation lediglich durch eine bekannte 16S rDNA-Sequenz; das Genom ist derzeit noch nicht bekannt.

Diese Veränderungen in der archaeellen Population können wahrscheinlich auf dramatisch veränderte physikochemische Parameter zurückgeführt werden, von denen die charakteristischsten im Folgenden beschrieben werden. Die Ammonium-Stickstoff-(NH₄⁺-N)-Konzentrationen erhöhten sich durch die Harnstoffzugabe auf bis zu 10,2 g/l in der leichten Hemmung und 16,9 g/l in der schweren Hemmung (siehe Anhang, Tabelle A1). In der Probe, in der eine Erholung von den erhöhten NH₄⁺-N-Konzentrationen simuliert werden sollte, konnte jedoch auch zwei Monate nach der letzten Harnstoffgabe keine Reduktion der NH₄⁺-N-Konzentration beobachtet werden. Die erhöhte NH₄⁺-N-Konzentration resultierte in einem erhöhten pH-Wert von bis zu 9 (im Vergleich zum konstanten pH-Wert der Kontrolle von 7,9-8,4), in allen Proben (siehe Anhang, Tabelle A2). In der Probe, in der eine Erholung simuliert werden sollte, ging der pH-Wert auf 8,5 zurück. Weiterhin blieben die FOS in der Kontrolle erwartungsgemäß konstant zwischen 3,2 und 4,1 g Essigsäureäquivalente pro l (g HAC_{eq}/l), während in der leichten Hemmung die Konzentration der FOS auf 5,8 g HAC_{eq}/l und in der schweren Hemmung auf 9,2 g HAC_{eq}/l anstieg (siehe Anhang, Tabelle A3). In der Erholungsprobe stieg die Konzentration der FOS auch ohne weitere Harnstoffzugabe auf bis zu 8,1 g HAC_{eq}/l an und sank nur schwach auf 7,6 g HAC_{eq}/l zum Zeitpunkt der Probenahme. Ebenso konnte ein Anstieg des gesamten anorganischen Kohlenstoffes (TAC) von 19,3 - 22,8 g CaCO₃/l in der Kontrolle auf 43,7 g CaCO₃/l in der leichten Hemmung und 68 g CaCO₃/l in der schweren Hemmung gemessen werden (siehe Anhang, Tabelle A4). Auch die TAC-Konzentration blieb in der erholten Probe erhöht auf 47 g CaCO₃/l zum Zeitpunkt der Probenahme. Außerdem konnte bereits in der leichten Hemmung ein Rückgang der Methanbildungsrate auf ca. 2 % der Methanbildungsrate in der Kontrolle nachgewiesen werden. In der Probe, in der eine Erholung simuliert werden sollte, war keine Methanbildung messbar (persönliche Mitteilung Dipl. Biol. Tobias Kern, Technische Universität Dresden). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Hemmung durch Ammonium-Akkumulation zu schwer war und die methanogene Biozönose irreversibel geschädigt war.

Da im ersten Ammonium-Toxizitätsversuch keine Erholung erreicht werden konnte, wurde der Versuch mit geringeren NH_4^+ -N-Konzentrationen von bis zu 5,4 g/l (leichte Hemmung) und bis 8,4 g/l (schwere Hemmung) wiederholt (siehe Anhang, Tabelle A5). In der Erholungsprobe stieg der NH_4^+ -N-Gehalt ebenfalls auf 5,2 g/l an, sank dann aber wieder auf 3,9 g/l, was nur leicht über dem Niveau der Kontrollen (1,7-2,8 g/l) lag. Daraus resultierten erhöhte pH-Werte von bis zu 8,5 in der leichten Hemmung und 8,8 in der schweren Hemmung im Vergleich zu den Kontrollen (7,8-8,1) (siehe Anhang, Tabelle A6). Die Erholung spiegelte sich in einem pH-Wert von bis zu 8,3 wider, der auf 8,0 zum Zeitpunkt der Probenahme zurückging. Außerdem stiegen die FOS von 2-3,4 g HAc_{eq} /l in den Kontrollen auf 4,4 g HAc_{eq} /l bzw. 6,9 g HAc_{eq} /l in der leichten und schweren Hemmung und auf 4,7 g HAc_{eq} /l in der Erholungsprobe (siehe Anhang, Tabelle A7). In dieser konnte anschließend ein Rückgang der FOS-Konzentration auf 3,7 g HAc_{eq} /l beobachtet werden. Ebenso erhöhte sich die Konzentration des TAC von 10,3-16,6 g CaCO_3 /l in den Kontrollen auf 23,9 g CaCO_3 /l (leichte Hemmung), 34,4 g CaCO_3 /l (schwere Hemmung) und 22,8 g CaCO_3 /l (Erholung) und reduzierte sich nach einer Erholungsphase auf 18,6 g CaCO_3 /l (siehe Anhang, Tabelle A8). Trotz dieser deutlichen Veränderungen in den physikochemischen Parametern konnte allerdings in der DGGE kein Unterschied in den Signal-Profilen der einzelnen Proben detektiert werden (Abbildung 24). Es ist demnach anzunehmen, dass sich die archaeelle Population an die Veränderungen der verschiedenen Einflussgrößen ausreichend adaptieren konnte, sodass es nicht zu einer Veränderung in der Zusammensetzung der Archaea gekommen ist.

Eine weitere häufige Form der Prozessstörung ist die Akkumulation von Säuren im Reaktor, die vielfach aufgrund von „Überfütterung“ auftritt. Um eine solche Störung zu simulieren, wurde im ersten Versauerungsversuch zusätzlich Glucose gefüttert. Diese führte jedoch nur zu einem sehr geringen Abfall des pH-Wertes von 8,0-8,5 in den Kontrollen und 7,8 in der versauerten Probe (siehe Anhang, Tabelle A9). In der Erholungsprobe regenerierte sich der pH-Wert von 7,7 wieder auf 8,1 zum Zeitpunkt der Probenahme. Dennoch stieg die Konzentration der Essigsäure von 0,06-0,13 g/l in den Kontrollen auf 1,5 g/l in der versauerten Probe (siehe Anhang, Tabelle A10). Während der Erholung sank die Konzentration der Essigsäure wieder von maximal 1,1 g/l auf 0,09 g/l, was dem Niveau der Kontrollen entspricht. Neben der Essigsäure stieg auch die Konzentration der Propionsäure leicht (siehe Anhang, Tabelle A11). Die Konzentration anderer prozessrelevanter Säuren (Buttersäure, iso-Buttersäure, Valeriansäure, iso-Valeriansäure, Capronsäure) blieb jedoch unter dem Detektionsminimum (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend konnte auch ein Anstieg der FOS von 3,3-4,3 g HAc_{eq} /l (Kontrollen) auf 5,2 (Versauerung) bzw. maximal 4,9 (Erholung) gemessen werden (siehe Anhang, Tabelle A12). In der Erholungsprobe sank die Konzentration der FOS nach Normalisierung der Fütterung wieder auf 3,9 g HAc_{eq} /l. Der FOS/TAC-Quotient lag in beiden Kontrollen sowie in der Erholung konstant zwischen 0,15 und 0,20 (siehe Anhang, Tabelle A13). In der

Versauerungsprobe stieg der FOS/TAC leicht auf 0,24. Trotz des leichten Anstieges der Säuren wurden jedoch in den DGGE-Profilen der Kontrolle und der Ansäuerung bzw. Erholung keine Veränderungen beobachtet (Abbildung 24). Es lässt sich also folgern, dass die zusätzliche Beschickung mit Glucose keinen negativen Einfluss auf die Zusammensetzung der archaeellen Biozönose hatte.

In einem zweiten Versauerungsversuch wurde die Akkumulation von Säuren durch die zusätzliche Fütterung von Speiseöl induziert (siehe 2.1.2.3) und die Versauerungsprobe erst nach Akkumulation von 5,6 g/l Essigsäure untersucht. Im Vergleich dazu waren in den Kontrollen Essigsäurekonzentrationen von 0,1-1 g/l zu messen (siehe Anhang, Tabelle A15). Wie auch beim ersten Versauerungsversuch konnte außerdem ein Anstieg der Propionsäure von maximal 0,35 g/l in den Kontrollen auf 2,0 g/l in der versauerten Probe gemessen werden (siehe Anhang, Tabelle A16). Die Konzentration der übrigen Säuren war nah am Detektionslimit bzw. nicht detektierbar. Daraus resultierten erhöhte FOS Konzentrationen (2,9-4,6 HAc_{eq} /l in den Kontrollen und 11,5 HAc_{eq} /l in der Versauerung) (siehe Anhang, Tabelle A 17) und verringerte pH-Werte (7,7-8,1 in den Kontrollen und 7,1 in der Versauerung) (siehe Anhang, Tabelle A14). Der FOS/TAC-Quotient, der in den Kontrollen zwischen 0,18 und 0,26 lag, stieg in der Versauerungsprobe ebenfalls stark an und erreichte ein Maximum von 1,04 zum Zeitpunkt der Probenahme (siehe Anhang, Tabelle A 18). In einer weiteren Probe („Erholung“) sollte zunächst eine Versauerung induziert und im Anschluss die Erholung des Reaktors simuliert werden. Überraschenderweise veränderten sich die physikochemischen Werte in dieser Probe, im Vergleich zu den Kontrollen nur sehr wenig, obwohl der Reaktor zunächst wie der der Versauerung beschickt wurde. Lediglich die Konzentration der Propionsäure (maximal 0,5 g/l) und der FOS/TAC-Quotient (0,24-0,35) waren im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. Dementsprechend konnten auch keine Unterschiede im DGGE-Muster der Erholung und Kontrolle detektiert werden. In der „versauerten“ Probe variierte das DGGE-Profil nur leicht. Hier waren zwei zusätzliche Signale zu detektieren, die jedoch nicht identifiziert werden konnten (Abbildung 24, schwarze Pfeile), zwei weitere Signale fehlten (Abbildung 24, weißer Pfeil). Dieses Resultat zeigt, dass die zusätzliche Beschickung mit CCM, im Gegensatz zur Fütterung mit Glucose, zumindest in einem Reaktor zu leichten Veränderungen der archaeellen Population geführt hat. Welche Faktoren ursächlich für das unterschiedliche Verhalten der beiden mit CCM beschickten Reaktoren waren, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden.

Ebenso wie die allgemeine archaeelle Diversität war auch die Diversität der *Methanobacteriales* während der verschiedenen Hemmversuche konstant. Lediglich die schwere Hemmung des ersten Ammonium-Toxizitäts-Versuches war durch das Fehlen einiger weniger Signale charakterisiert (Abbildung 25, weiße Pfeile). In den Proben der anderen Versuche zur Prozessstörung konnten jeweils gleiche DGGE-Profile detektiert werden. Dabei war die Signalverteilung der ersten

Ammonium-Intoxikation und der ersten Versauerung vergleichbar mit dem typischen DGGE-Profil aus Anlage A (Abbildung 25, „Mrz_2013“). In den Proben der zweiten Ammonium-Intoxikation und Versauerung hingegen fehlten viele Signale und lediglich im unteren Gelbereich konnten drei Signale detektiert werden. Ein ähnliches DGGE-Profil war bereits in den Proben aus Anlage A im Jahr 2015 zu beobachten (vergleiche Abbildung 15). Daraus lässt sich folgern, dass die Diversität der *Methanobacteriales* in allen Hemmversuchen erwartungsgemäß die der Anlage A zum Entnahmezeitpunkt widerspiegelt.

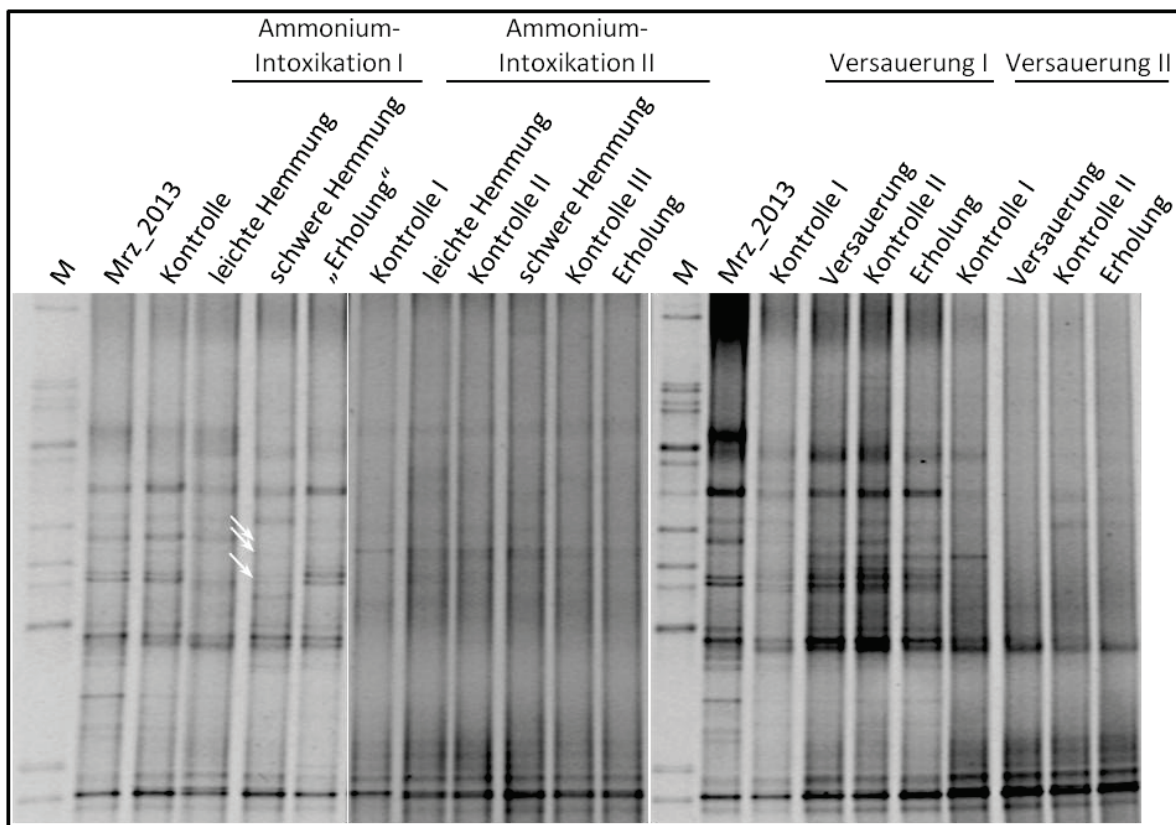


Abbildung 25: Dynamik der spezifischen *Methanobacteriales*-DGGE-Profile während Prozessstörungen.

Nach Amplifikation mit Hilfe der Primer Mbt857f_GC und Mbt1196r wurden die DNA-Fragmente im 40-70 %igen denaturierenden Gradienten aufgetrennt. Vergleichend ist die Probe vom März 2013 aus Anlage A („Mrz_2013“) dargestellt. Weiße Pfeile: Fehlende Signale bzw. Signale geringerer Intensität. M: Marker.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der DGGE konnten mit Hilfe der qPCR Organismen des Genus *Methanoculleus* als die dominierenden Archaea während des ersten Hemmversuches zur Ammonium-Intoxikation bestimmt werden. Einhergehend mit dem dramatischen Anstieg der Ammoniumkonzentration in der schweren Hemmung ging allerdings deren Abundanz stark zurück, sodass in der Probe der schweren Hemmung nur noch weniger als 1 % Archaea im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden konnten (Abbildung 26). In der Erholungsprobe konnten sich die archaeellen Zellzahlen nicht auf das Niveau der Kontrolle regenerieren. Die Zellzahlen der Bacteria hingegen blieben über den gesamten Versuchszeitraum konstant. In den

weiteren durchgeführten Hemmversuchen konnten, wie auch schon in der DGGE, keine Veränderungen der Biozönose detektiert werden.

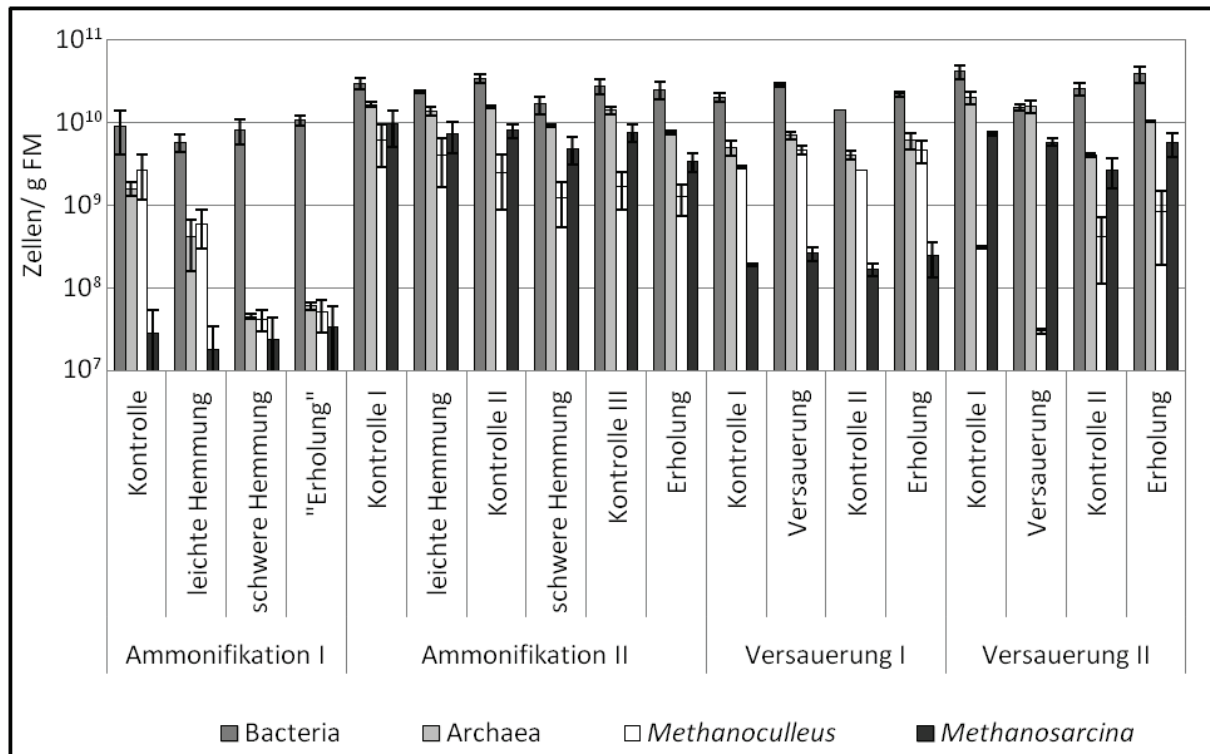


Abbildung 26: Abundanzen der Bacteria, Archaea sowie der Genera *Methanoculleus* und *Methanosarcina* während der Prozessstörungen.

Die jeweiligen 16S rDNA Kopienzahlen wurden mit Hilfe der qPCR ermittelt und daraus die Zellzahlen pro g Frischmasse (FM) bestimmt. Die Standardabweichungen wurden aus mindestens sechs Replikaten errechnet.

Zur Validierung der qPCR-Ergebnisse wurden die Proben der Hemmversuche zusätzlich mittels CARD-FISH untersucht. Dabei war eine Hybridisierung der gehemmten Proben des ersten Ammonium-Toxizitäts-Versuches nicht möglich, sodass dieser Versuch nicht mit Hilfe der CARD-FISH analysiert werden konnte. In den übrigen Versuchen zeigte sich die auch schon in der DGGE und qPCR dargestellte konstante Biozönose während der Ammonium- und Säurehemmung (Abbildung 27). Auch der geringe Anteil von Organismen der Ordnung *Methanosarcinales* an der gesamten Biozönose in den Proben des ersten Versauerungsversuches wurde in der CARD-FISH bestätigt.

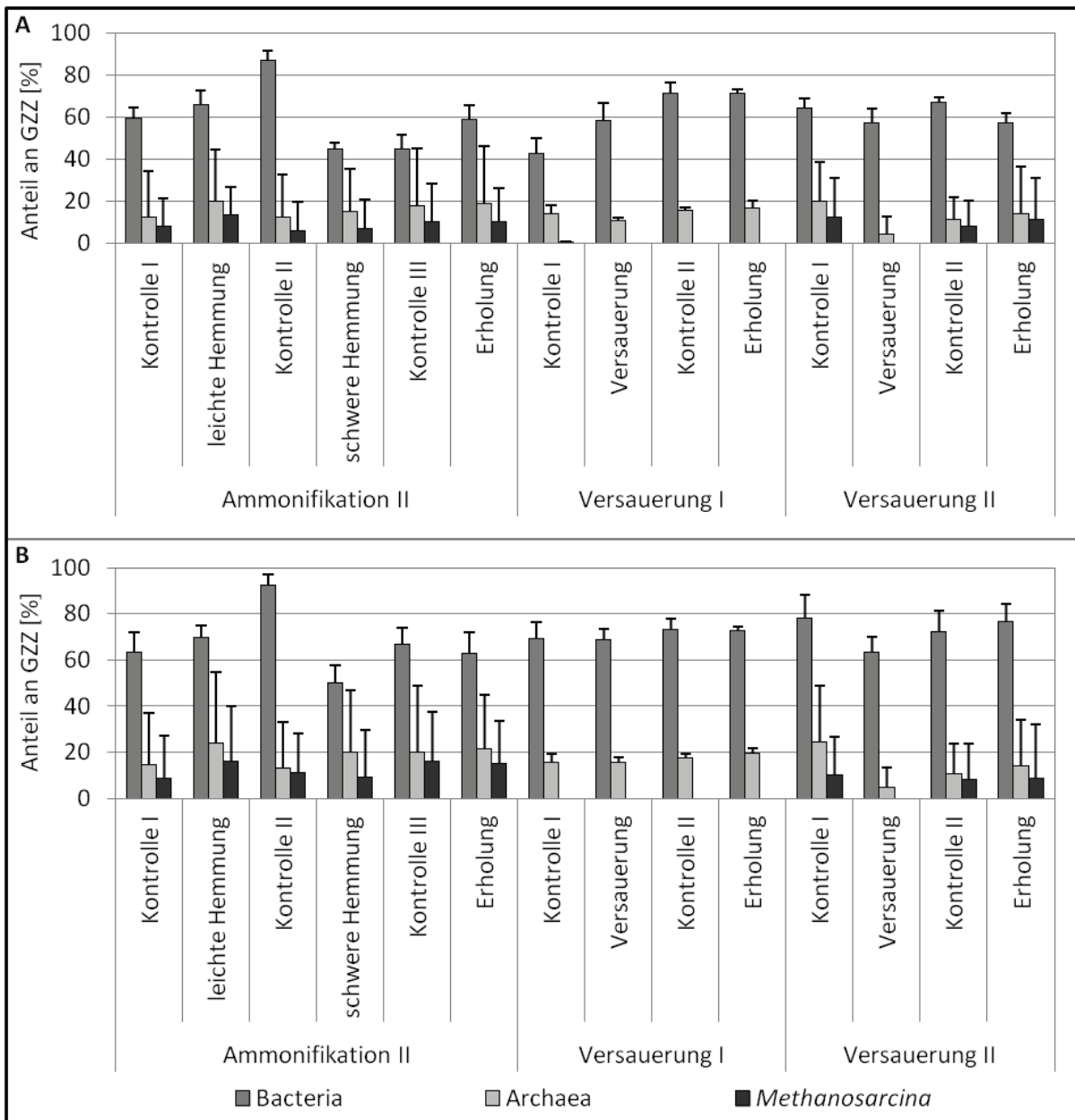


Abbildung 27: Mittels CARD-FISH bestimmte relative Abundanzen der Bacteria, Archaea und *Methanosarcina* bei Prozessstörungen.

Nach Vorbehandlung der Proben mit Pectinex (A) und Tween80 (B) wurden die Zellen unter Verwendung der Sonden EUB I-III (Bacteria), A915 (Archaea) und MSMX860 (*Methanosarcinales*) mit Hilfe eines optimierten CARD-FISH-Protokolls hybridisiert. Die Standardabweichungen wurden aus mindestens fünf Einzelzählungen von insgesamt mindestens 400 Zellen (Bacteria und Archaea) bzw. mindestens zehn Einzelzählungen (*Methanosarcinales*) berechnet.

Um einen detaillierteren Einblick in die Dynamik der archaeellen Population während Prozessstörungen zu gewinnen, wurden die Proben des ersten Versuchs zur Ammonium-Intoxikation sowie des zweiten Versuchs zur Versauerung zusätzlich mittels 16S-Amplikonsequenzierung analysiert.

Tabelle 35: Durch Archaea-spezifische 454-Amplikonsequenzierung erfasste Anzahl der Sequenzen und OTUs sowie Diversitätsindizes verschiedener Hemmpuben.

		Anzahl Sequenzen	Abdeckung („coverage“) [%]	Anzahl OTUs	inverser Simpson- Index	Chao1 (Konfidenz- Intervall)	ACE (Konfidenz- Intervall)
Ammonium-Intoxikation	Kontrolle	3666	99,4	40	3,2	110 (62-268)	151 (108-222)
	leichte Hemmung	2245	99,7	20	2,2	35 (23-89)	33,2 (25-59)
	Schwere Hemmung	501	99,4	26	8,0	27 (26-32)	28 (26-36)
	„Erholung“	936	99,4	29	7,4	33 (30-51)	34 (30-50)
Versauerung II	Kontrolle I	6847	99,8	29	1,2	49 (34-102)	44 (34-78)
	Versauerung	8676	99,7	48	1,6	121 (75-243)	157 (110-241)
	Kontrolle II	4233	99,5	37	1,2	63 (46-114)	66 (48-116)
	Erholung	4984	99,5	36	1,2	111 (61-261)	324 (224-478)

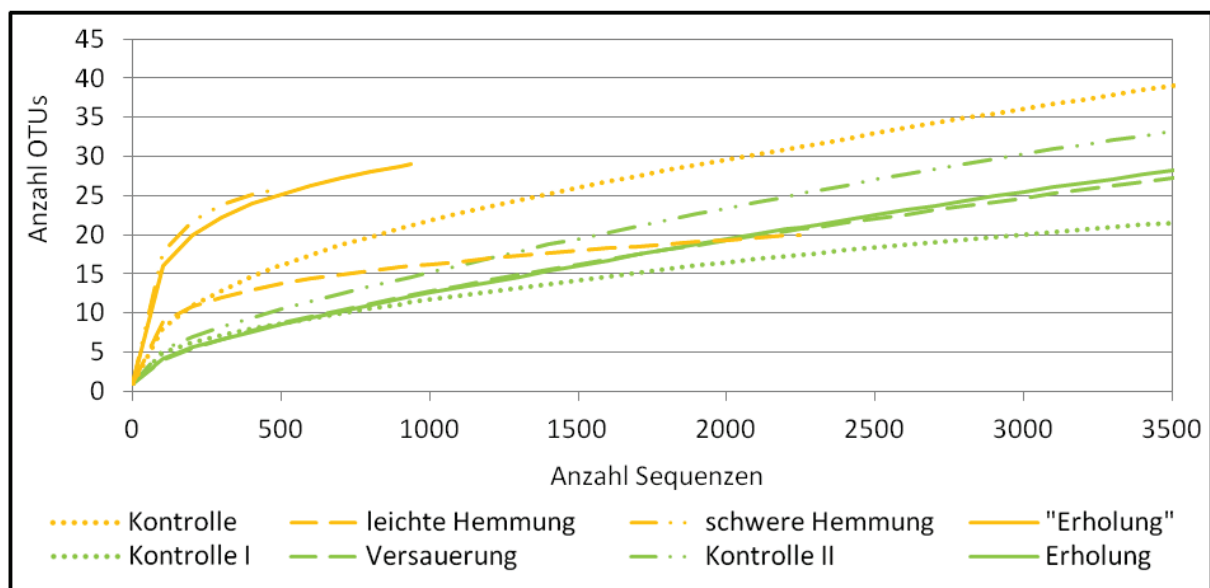


Abbildung 28: Aus der Archaea-spezifischen 454-Amplikonsequenzierung resultierende *rarefaction*-Kurven verschiedener Hemmpuben.

Die *rarefaction*-Kurven wurden aus der Anzahl der OTUs mit einer Sequenz-Dissimilarität von $\leq 3\%$ pro Anzahl der Sequenzen berechnet. Orange: Ammonium-Intoxikation I; grün: Versauerung II.

Die Anzahl der nach der Qualitätskontrolle verbleibenden Sequenzen sowie der OTUs war dabei in den einzelnen Proben sehr unterschiedlich. Insbesondere bei den Proben der schweren Hemmung und „Erholung“ (Ammonium-Intoxikation I) konnten nur sehr wenige Sequenzen

ausgewertet werden (Tabelle 35). Dennoch war die Abdeckung in allen untersuchten Proben über 99 %. Dementsprechend konnte in allen *rarefaction*-Kurven ein abnehmender Anstieg beobachtet werden (Abbildung 28). Das deutet darauf hin, dass die aus der 454-Amplikonsequenzierung resultierenden Sequenzen die Diversität in den untersuchten Hemmproben gut widerspiegeln. Auch die anhand des Chao1- und ACE-Index postulierte Anzahl der OTUs stimmte in den meisten Proben mit der tatsächlichen Zahl der OTUs fast überein. Lediglich in der Kontrolle (Ammonium-Intoxikation I) sowie der Versauerung und Erholung (Versauerung II) lagen beide Indices höher, als die ermittelte OTU-Anzahl. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Sequenzanzahl in den Proben ist jedoch ein Vergleich der Diversitätsindices untereinander nur eingeschränkt möglich.

Die Artenzusammensetzung der Kontrolle zur Ammonium-Intoxikation spiegelt die der Anlage A zum Zeitpunkt der Materialentnahme (Mai 2014) wider. Ca. 99,5 % aller Sequenzen gehörten dem Phylum der *Euryarchaeota* an. Vereinzelt wurden auch Sequenzen des Phylums *Thaumarchaeota* (*Nitrosphaera*) nach RDP bzw. *Crenarchaeota* (Soil-Crenarchaeotic-Gruppe) nach Silva gefunden.

Dominierender archaeeller Vertreter (≈ 45 % aller Sequenzen) war der Genus *Methanoculleus* (Abbildung 29). Außerdem wurden ≈ 25 % aller Sequenzen als *Methanomassiliicoccus*¹ identifiziert. Weitere Genera waren nur in sehr geringer Zahl zu finden. Bei leichter Ammoniumhemmung veränderte sich die archaeelle Zusammensetzung nur wenig. Lediglich die relative Abundanz von *Methanoculleus* stieg auf ≈ 66 %, während die von *Methanomassiliicoccus* auf ≈ 15 % sank. Bei schwerer Ammoniumhemmung hingegen konnten sehr deutliche Veränderungen in der archaeellen Biozönose detektiert werden. So waren hier nach RDP nur ≈ 89 % aller Sequenzen den *Euryarchaeota* zuzuordnen, während ≈ 7 % zu den *Thaumarchaeota* (*Nitrosphaera*) gehörten. Außerdem ging der Anteil von *Methanoculleus* auf lediglich ≈ 12 % zurück. Im Gegensatz dazu stieg die relative Abundanz von *Methanobacterium* (≈ 30 %), *Methanobrevibacter* (≈ 9 %), *Methanosphaera* (≈ 5 %) und *Methanosarcina* (≈ 11 %) deutlich. Nach der Silva-Taxonomie konnten außerdem ≈ 5 % den *Methanimicrococcus* zugeordnet werden. Die entsprechenden OTUs waren mittels RDP ebenfalls den *Methanosarcinaceae* zuzuordnen, jedoch auf Art-Ebene nicht eindeutig klassifizierbar (78 % Sequenzidentität mit *Methanimicrococcus*). Demnach scheint die archaeelle Diversität als Reaktion auf den Ammoniumstress zu steigen. Das spiegelt sich auch in einer Erhöhung des inversen Simpson-Index wider. Wie bereits beschrieben, war eine Regeneration des Reaktors nach der Ammoniumintoxikation nicht mehr möglich. Es ist daher nicht überraschend, dass die archaeelle Biozönose der „Erholung“ im Vergleich zur schweren Hemmung nahezu unverändert blieb. Lediglich die relative Abundanz des Genus *Methanosphaera* stieg deutlich auf ≈ 19 % an.

¹Die Klassifizierung dieser OTUs erfolgte nach RDP zum Genus *Thermogymnomonas*, allerdings nur mit einer Konfidenz unter 90 %. Daher wurde die Zuordnung mittels RDP-Classifer zum Genus *Methanomassiliicoccus* dargestellt (Konfidenz: 100 %). Bei Verwendung der Silva-Klassifizierung wurden diese Sequenzen in die Terrestrial-Miscellaneous-Gruppe (*Thermoplasmatales*) eingeordnet.

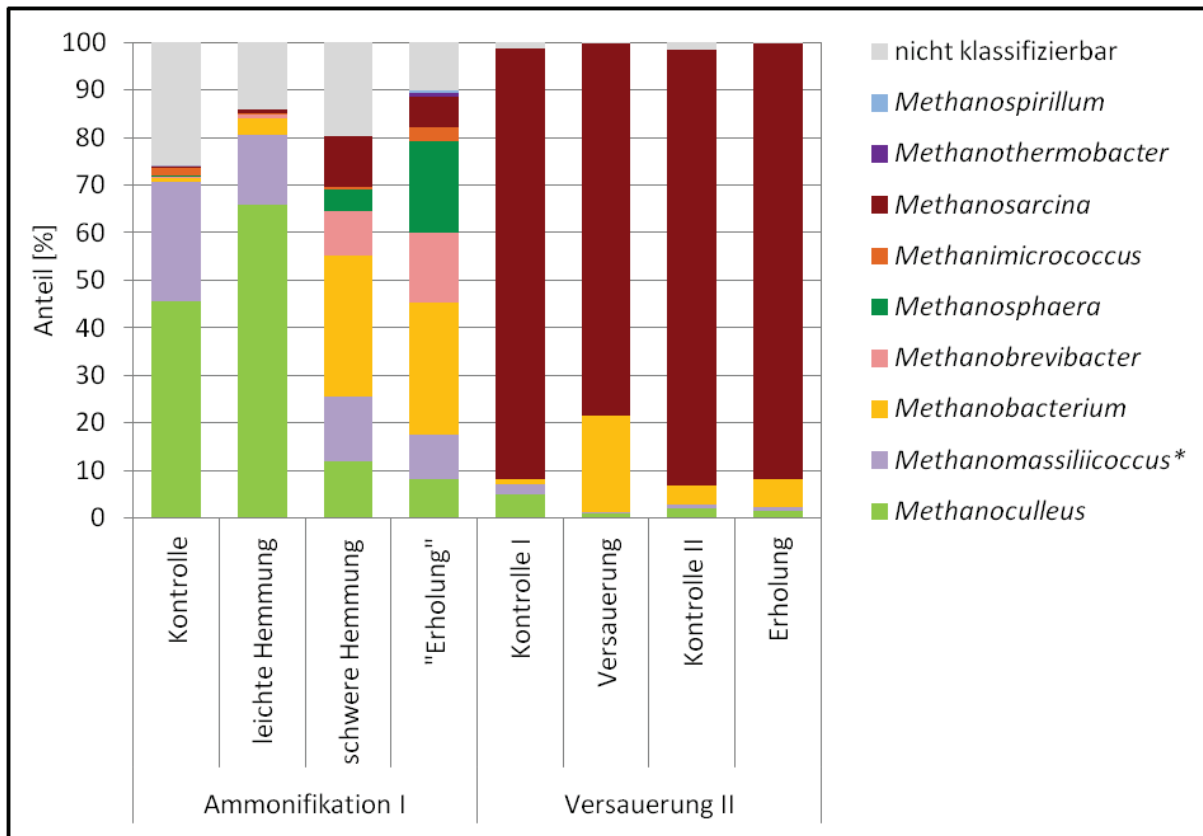


Abbildung 29: Durch Archaea-spezifische 454-Amplikonsequenzierung bestimmte Dynamik der einzelnen Genera im Verlauf von Prozessstörungen.

Dargestellt sind die Anteile der mittels RDP-Taxonomie klassifizierten Sequenzen an der gesamt-Anzahl der Sequenzen auf Genus-Ebene. Die genauen Prozentsätze sind dem Anhang (Tabelle A19) zu entnehmen. *: Aufgrund der höheren Konfidenz erfolgte die Zuordnung mit Hilfe des RDP-Classifiers.

Die archaeelle Zusammensetzung in den Proben des zweiten Versauerungsversuches unterschied sich grundlegend von der des Ammonium-Toxizitäts-Versuches. Dies liegt in der unterschiedlichen mikrobiellen Zusammensetzung des Fermentermaterials aus Anlage A zum Entnahmezeitpunkt begründet. In allen Proben konnte fast jede der enthaltenen Sequenzen ($\geq 99,8\%$) dem Phylum der *Euryarchaeota* zugeordnet werden. Die überwiegende Mehrzahl dieser Sequenzen wurden als *Methanosarcina* ($\approx 90-92\%$) identifiziert (Abbildung 29), was die archaeelle Biozönose der Anlage A im Januar 2015 widerspiegelt. Lediglich in der versauerten Probe war die relative Abundanz der Methanosarcinen mit $\approx 78\%$ etwas geringer. In dieser Probe konnte außerdem ein erhöhter Anteil von Organismen des Genus *Methanobacterium* von $\approx 20\%$ im Vergleich zu $\approx 1-6\%$ in den übrigen Proben detektiert werden. Wie bereits die Ergebnisse der Archaea-DGGE zeigt also auch die 454-Amplikonsequenzierung eine leichte Veränderung der archaeellen Zusammensetzung im versauerten Reaktor, während die Population der Archaea in der Erholung mit denen in den Kontrollen vergleichbar war. *Methanoculleus* konnte nur in geringer Zahl gefunden werden ($\approx 1-5\%$).

3.2.2 Archaeelle Biozönose der Anlagen B und C

Um zu überprüfen, ob die mikrobielle Biozönose der Anlage A repräsentativ für weitere, ähnlich betriebene Anlagen ist, wurden zusätzlich Proben aus den Anlagen B und C untersucht. Beide Anlagen werden in einem ähnlichen Temperatur- und pH-Bereich betrieben wie Anlage A (siehe Tabelle 2) und nutzen ebenfalls Maissilage als Hauptsubstrat. Anlage C wurde dabei mit einem geringeren Maissilage-Anteil als Anlage A (64 bis 69 %) von lediglich 27 bis 48 % beschickt, während in Anlage B ein ähnlicher Maissilage-Anteil von 51 bis 70 % genutzt wurde. Außerdem unterschieden sich die zusätzlich genutzten Substrate: Während in Anlage A lediglich Rindermist und Hühnertrockenkot verwendet wurden, kamen in den Anlagen B und C außerdem Grünroggen-Ganzpflanzensilage, Rindergülle, Pferdemist, Schweinegülle, Grassilage und Weizenkörner zum Einsatz (siehe Tabelle 3).

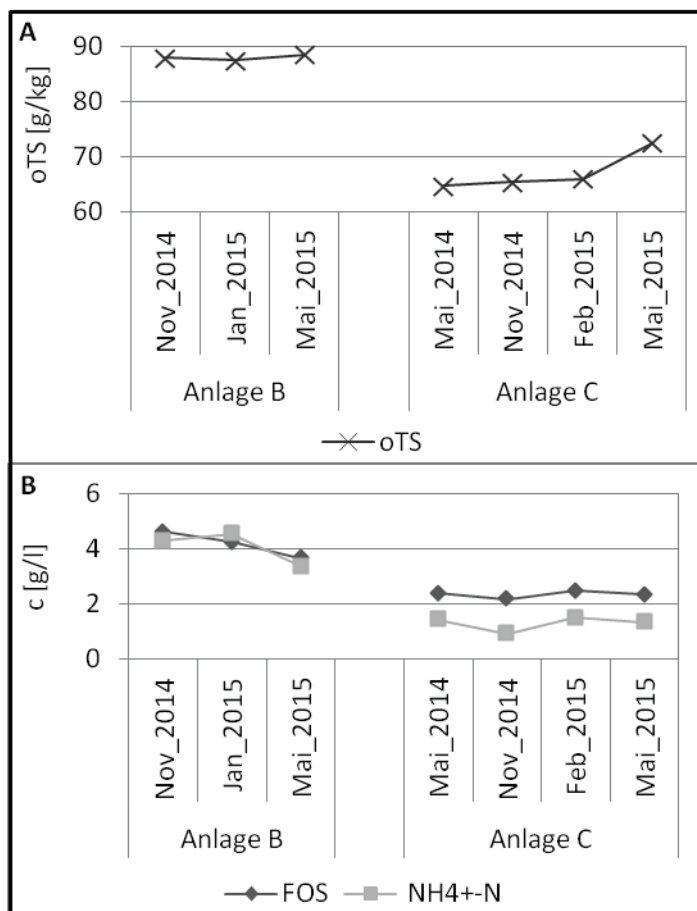


Abbildung 30: Chemische Charakterisierung der Anlagen B und C.

Die nach EN 12879:2000 bestimmte organische Trockensubstanz (oTS) (A), die durch potentiometrische Titration ermittelte Konzentration der flüchtigen organischen Säuren FOS (bezogen auf das g Essigsäureäquivalente pro l) sowie der mittels gassensitiver Ammoniakelektrode gemessene Ammonium-Stickstoff (NH₄⁺-N) (B) wurden durch die Firma Bioreact/Bonalytic (Troisdorf, D) zur Verfügung gestellt.

Bedingt durch die variierende Fütterung zeichneten sich die Anlagen B und C durch unterschiedliche chemische Bedingungen aus, die in Abbildung 30 dargestellt sind. Dabei entsprach die oTS in Anlage B mit ca. 88 g/kg in etwa der in Anlage A im Jahr 2014, während die oTS der Anlage C mit lediglich ca. 65 g/kg mit Anlage A im Jahr 2015 vergleichbar war (Abbildung 30 A). Ebenso verhielten sich die FOS in Anlage B (3,6-4,6 g/l) wie die der Anlage A im Jahr 2014 und die FOS in Anlage C (ca. 2,3 g/l) entsprachen Anlage A im Jahr 2015. Die Konzentration des $\text{NH}_4^+\text{-N}$ in Anlage B (3,4-4,5 g/l) war ebenfalls vergleichbar mit der in Anlage A. Im Gegensatz dazu zeichnete sich Anlage C durch eine deutlich geringere $\text{NH}_4^+\text{-N}$ Konzentration von durchschnittlich 1,3 g/l aus (Abbildung 30 B).

Zur Erfassung der archaeellen Diversität wurden die Proben mittels DGGE und Klonbank untersucht. Die dabei detektierten Signalprofile waren denen aus Anlage A sehr ähnlich und zeigten im untersuchten Zeitraum keine Variationen (Abbildung 31). Alle Signale der Anlage B, die durch eine entsprechende Klonbank phylogenetisch identifiziert werden konnten, gehörten dem Genus *Methanoculleus* an und waren nah mit *M. bourgensis* Stamm MS2^T verwandt (Tabelle 36). Im Gegensatz dazu waren die meisten Signale der Anlage C dem Genus *Methanosarcina* zuzuordnen (Tabelle 37). Ebenso wie bereits in Anlage A waren dabei jeweils mehrere Signale auf nur eine Sequenz zurückzuführen, was die limitierte archaeelle Diversität in beiden Anlagen unterstreicht.

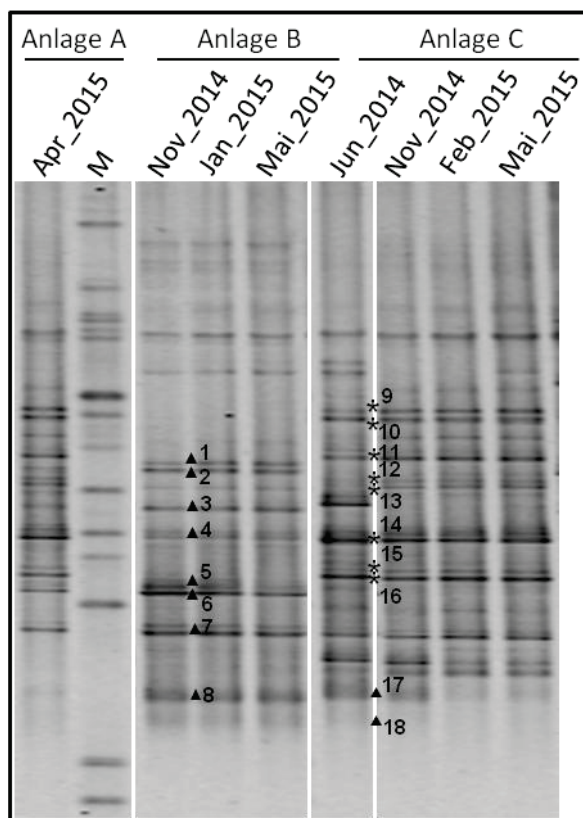


Abbildung 31: Archaeelle DGGE-Profile der Proben aus den Anlagen B und C im Vergleich zu Anlage A.

Spezifische 16S rDNA Fragmente wurden mit Hilfe der Primer Parch340f und A915r_GC amplifiziert und in einem 40-70 % denaturierenden Gradienten gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die phylogenetische Zuordnung der nummerierten Signale erfolgte durch Sequenzierung entsprechender Klone. Dreiecke: *Methanoculleus*-spezifische Signale, Sternchen: *Methanosarcina*-spezifische Signale, M: Marker.

Tabelle 36: Phylogenetische Einordnung der Archaea-spezifischen DGGE-Signale mittels Klonen aus Anlage B.

Signal	Identifikation durch	Klassifikation nach RDP [Konfidenz]	Nächster Verwandte nach NCBI [Sequenzidentität] ¹
1-7	Klon 8	<i>Methanoculleus</i> [100%]	<i>M. bourgensis</i> Stamm MS2 ^T [99 %]
	Klon 15	<i>Methanoculleus</i> [100%]	<i>M. bourgensis</i> Stamm MS2 ^T [99 %]
8	Klon 12	<i>Methanoculleus</i> [100%]	<i>M. bourgensis</i> Stamm MS2 ^T [93 %] ²
*	Klon 14	<i>Methanoculleus</i> [100%]	<i>M. bourgensis</i> Stamm MS2 ^T [96 %] ²

Die Nummerierungen der DGGE-Signale sind der Abbildung 31 zu entnehmen.

*Dieser Klon korrespondiert mit keinem DGGE-Signal.

¹Es wurden nur Organismen einbezogen, deren gesamte Genom-Sequenz bekannt ist.

²Durch Einbeziehen von Organismen, deren 16S rDNA Sequenz, aber nicht das Genom bekannt sind, konnte kein näher verwandter Organismus identifiziert werden.

Tabelle 37: Taxonomische Zuordnung der archaeellen DGGE-Signale mit Hilfe spezifischer Klone aus Anlage C.

Signal	Identifikation durch	Klassifikation nach RDP [Konfidenz]	Nächster Verwandte nach NCBI [Sequenzidentität] ¹
9-16	Klon 5	<i>Methanosarcina</i> [100%]	<i>M. thermophila</i> Stamm TM-1 [98 %]
	Klon 10	<i>Methanosarcina</i> [100%]	<i>M. thermophila</i> Stamm TM-1; <i>M. barkeri</i> Stämme Wiesmoor, Fusaro; <i>M. sicilae</i> Stamm C2J [je 99 %]
17, 18	Klon 7	<i>Methanoculleus</i> [100%]	<i>M. bourgensis</i> MS2 ^T [99 %]
*	Klon 18	<i>Methanosarcina</i> [100%]	<i>M. thermophila</i> Stamm TM-1; <i>M. barkeri</i> Stämme Wiesmoor, Fusaro; <i>M. sicilae</i> Stamm C2J; <i>M. horonobensis</i> Stamm HB-1 [je 99 %]

Die Nummerierungen der DGGE-Signale sind der Abbildung 31 zu entnehmen.

*Dieser Klon korrespondiert mit keinem DGGE-Signal.

¹Es wurden nur Organismen einbezogen, deren gesamte Genom-Sequenz bekannt ist.

Auch in den Proben aus den Anlagen B und C wurde zusätzlich die Diversität der *Methanobacteriales* näher charakterisiert (Abbildung 32). Dabei konnte im untersuchten Zeitraum in den Proben beider Anlagen jeweils sehr ähnliche DGGE-Profile detektiert werden, die auf eine stabile Biozönose der *Methanobacteriales* hinweisen. Lediglich im Mai 2015 waren in Anlage C leichte Variationen zu beobachten. Auffällig ist auch die große Ähnlichkeit der DGGE-Muster zu Anlage A. Im Gegensatz zu dieser Anlage war jedoch in den Biogasreaktoren B und C eine eindeutige phylogenetische Einordnung der meisten Signale zu einzelnen Taxa durch entsprechende Klonbanken möglich. So konnten die Hauptsignale 1 bis 5 von Anlage B dem Genus *Methanobrevibacter* zugeordnet werden; die am nächsten verwandten bekannten Arten waren *Methanobrevibacter smithii* bzw. *Methanobrevibacter ruminantium* (Tabelle 38). Außerdem zeigten zwei Signale (6 und 7) hohe Sequenzidentität mit *Methanobacterium formicicum*. Daneben konnten eine Reihe weitere

Klone, die sich jedoch nicht im typischen DGGE-Profil wiederfinden, den Genera *Methanobacterium* und *Methanobrevibacter* zugeordnet werden. Alle aus Anlage C klonierten Sequenzen zeigten hohe Sequenzähnlichkeiten mit verschiedenen Stämmen des Genus *Methanobacterium* (Tabelle 39), sodass in dieser Anlage von einer sehr limitierten Diversität der *Methanobacteriales* ausgegangen werden kann. Einzige Ausnahme bildet der Klon 12, der nicht eindeutig taxonomisch einzuordnen war und im typischen DGGE-Profil der Anlage C nicht detektiert wurde.

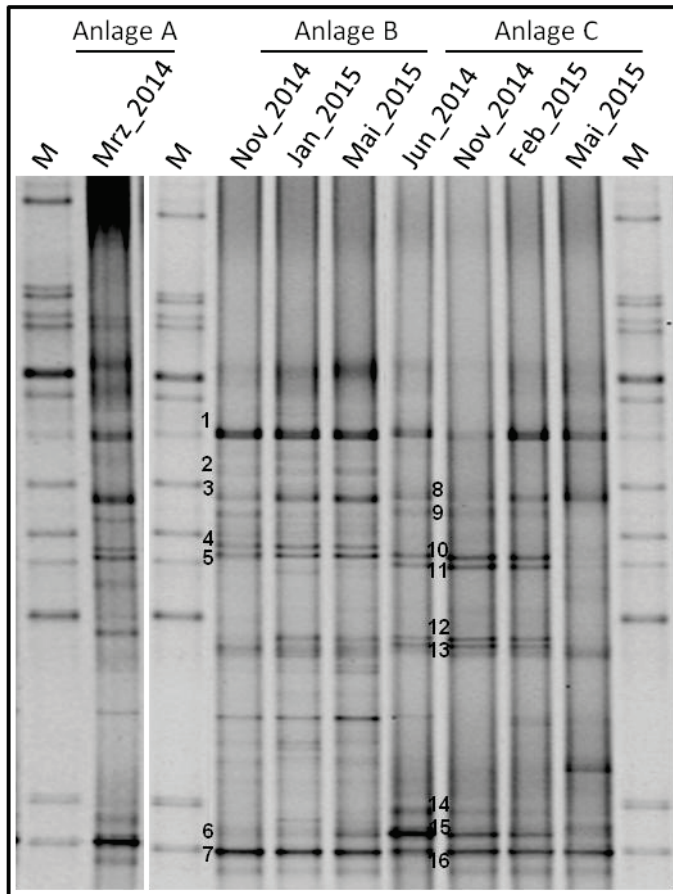


Abbildung 32: Mittels DGGE visualisierte Biozönose der *Methanobacteriales* in den Anlagen B und C im Vergleich zu Anlage A.

Nach Amplifikation der 16S rDNA Fragmente mit Hilfe der Primer Mbt857f_GC und Mbt1196r wurden diese in einem 40-70 % denaturierenden Gradienten gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nummerierte Signale konnten durch Zuordnung entsprechender Klone einer spezifischen Klonbank phylogenetisch eingeordnet werden. M: Marker.

Tabelle 38: Durch Klonierung erfasste Diversität der *Methanobacteriales* in Anlage B und deren Zuordnung zu prominenten DGGE-Signalen.

Signal	Identi- fikation durch	Klassifikation nach RDP [Konfidenz]	Nächster Verwandte nach NCBI [Sequenzidentität] ¹
1	Klon 16	<i>Methanobrevibacter</i> [100%]	<i>Methanobrevibacter smithii</i> Stämme DSM 2374, ATCC 35061 [je 98 %]
	Klon 17	<i>Methanobrevibacter</i> [100%]	<i>Methanobrevibacter smithii</i> Stämme DSM 2374, ATCC 35061 [je 98 %]
2-5	Klon 4	<i>Methanobrevibacter</i> [98%]	<i>Methanobrevibacter ruminatum</i> Stamm M1 [99 %]
	Klon 11	<i>Methanobrevibacter</i> [98%]	<i>Methanobrevibacter ruminatum</i> Stamm M1 [98 %]

Tabelle 38 (Fortsetzung): Durch Klonierung erfasste Diversität der *Methanobacteriales* in Anlage B und deren Zuordnung zu prominenten DGGE-Signalen.

Signal	Identifikation durch	Klassifikation nach RDP [Konfidenz]	Nächster Verwandte nach NCBI [Sequenzidentität] ¹
6,7	Klon 6	<i>Methanobacteriaceae</i> [100%] <i>Methanobacterium</i> [96%]	<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm BRM9 [99 %]
	Klon 5	<i>Methanobacterium</i> [100%]	<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm BRM9; <i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1; <i>Methanobacterium paludis</i> Stamm SWAN-1 [je 99 %]
	Klon 7	<i>Methanobacteriaceae</i> [100%] <i>Methanobrevibacter</i> [75%]	<i>Methanobrevibacter</i> sp. Stamm AbM4 [99%]
	Klon 8	<i>Methanobrevibacter</i> [99%]	<i>Methanobrevibacter smithii</i> Stämme DSM 2374, ATCC 35061 [je 100%]
	Klon 9	<i>Methanobacteriaceae</i> [100%] <i>Methanobacterium</i> [90%]	<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm BRM9; <i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1; <i>Methanobacterium lacus</i> Stamm AL-21; <i>Methanobrevibacter arboriphilus</i> Stamm ANOR1 [je 99 %]
*	Klon 12	<i>Methanobacteriaceae</i> [100%] <i>Methanosphaera</i> [78%]	<i>Methanospaera stadtmanae</i> DSM 3091 [98 %]
	Klon 13	<i>Methanobacterium</i> [100%]	<i>Methanobacterium formicicum</i> Stämme BRM9, DSM 1535; <i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1 [je 99 %]
	Klon 14	<i>Methanobacteriaceae</i> [100%] <i>Methanobacterium</i> [59%]	<i>Methanobacterium lacus</i> Stamm AL-21; <i>Methanobrevibacter arboriphilus</i> Stamm ANOR1 [je 98 %]
	Klon 15	<i>Methanobacteriaceae</i> [100%] <i>Methanobacterium</i> [72%]	<i>Methanobacterium formicicum</i> Stämme BRM9, DSM 1535 [je 96 %]
	Klon 18	<i>Methanobrevibacter</i> [100%]	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i> Stamm M1 [98 %]
	Klon 20	<i>Methanobacteriaceae</i> [100%] <i>Methanobacterium</i> [96%]	<i>Methanobacterium formicicum</i> Stämme BRM9, DSM 1535; <i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1 [je 99 %]

Die Nummerierungen der DGGE-Signale sind der Abbildung 32 zu entnehmen.

*Diese Klone stimmen mit keinem DGGE-Signal überein.

¹Es wurden nur Organismen einbezogen, deren gesamte Genom-Sequenz bekannt ist.

Tabelle 39: Diversität der *Methanobacteriales* in Anlage C und phylogenetische Einordnung entsprechender DGGE-Signale.

Signal	Identi- fikation durch	Klassifikation nach RDP [Konfidenz]	Nächster Verwandte nach NCBI [Sequenzidentität] ¹
8-13	Klon 8	<i>Methanobacterium</i> [98%]	<i>Methanobacterium formicicum</i> Stämme BRM9, DSM 1535; <i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1; <i>Methanobacterium lacus</i> Stamm AL-21 [je 98 %]
	Klon 12	<i>Methanobacterium</i> [98%]	<i>Methanobacterium formicicum</i> Stämme BRM9, DSM 1535; <i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1 [je 99 %]
14	Klon 9	<i>Methanobacteriaceae</i> [100%] <i>Methanobacterium</i> [94%]	<i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1 [99 %]
	Klon 1	<i>Methanobacterium</i> [98%]	<i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1 [100 %]
	Klon 5	<i>Methanobacterium</i> [97%]	<i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1 [100 %]
15, 16	Klon 8	<i>Methanobacterium</i> [98%]	<i>Methanobacterium formicicum</i> Stämme BRM9, DSM 1535; <i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1; <i>Methanobacterium lacus</i> Stamm AL-21 [je 98 %]
	Klon 12	<i>Methanobacterium</i> [98%]	<i>Methanobacterium formicicum</i> Stämme BRM9, DSM 1535; <i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1 [je 99 %]
	Klon 13	<i>Methanobacteriaceae</i> [100%] <i>Methanobacterium</i> [92%]	<i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1 [99 %]
*	Klon 3	<i>Methanobacterium</i> [100%]	<i>Methanobacterium formicicum</i> Stämme BRM9, DSM 1535; <i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1; <i>Methanobacterium paludis</i> Stamm SWAN-1 [je 99 %]
	Klon 4	<i>Methanobacteriaceae</i> [100%] <i>Methanobacterium</i> [88%]	<i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1 [99 %]
	Klon 10	<i>Methanobacteriaceae</i> [100%] <i>Methanobacterium</i> [95%]	<i>Methanobacterium formicicum</i> Stämme BRM9, DSM 1535; <i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1 [je 98 %]

Tabelle 39 (Fortsetzung): Diversität der *Methanobacteriales* in Anlage C und phylogenetische Einordnung entsprechender DGGE-Signale.

Signal	Identi- fikation durch	Klassifikation nach RDP [Konfidenz]	Nächster Verwandte nach NCBI [Sequenzidentität] ¹
*	Klon 14	<i>Methanobacteriaceae</i> [100%] <i>Methanobacterium</i> [96%]	<i>Methanobacterium formicicum</i> Stämme BRM9, DSM 1535; <i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1 [je 99 %]
	Klon 16	<i>Methanobacteriaceae</i> [100%] <i>Methanobacterium</i> [96%]	<i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1 [100 %]

Die Nummerierungen der DGGE-Signale sind der Abbildung 32 zu entnehmen.

*Diese Klone stimmen mit keinem DGGE-Signal überein.

¹Es wurden nur Organismen einbezogen, deren gesamte Genom-Sequenz bekannt ist.

Wie bereits in Anlage A wurden auch in den Anlagen B und C die Abundanzen der Bacteria und Archaea sowie der Genera *Methanoculleus* und *Methanosarcina* mittels qPCR bestimmt. In beiden Anlagen konnten ähnliche Gesamtzellzahlen von $3\text{-}5 \times 10^{10}$ Zellen/g FM ermittelt werden. Davon waren in beiden Reaktoren ca. $2\text{-}4 \times 10^{10}$ Bacteria/g FM (Abbildung 33). Die archaeellen Zellzahlen waren mit $1\text{-}2 \times 10^{10}$ Zellen/g FM in Anlage C etwas höher als in Anlage B ($4\text{-}6 \times 10^9$ Zellen/g FM). Daraus ergeben sich für Anlage B ein Bacteria:Archaea Verhältnis von ca. 6:1 und in Anlage C von 2:1 bis 3:1. Die Abundanzen der Genera *Methanoculleus* und *Methanosarcina* unterschieden sich in beiden Anlagen jedoch deutlich. In Anlage B dominierten mit $2\text{-}5 \times 10^9$ Zellen/g FM Organismen des Genus *Methanoculleus* die Population der Archaea, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der DGGE ist. Im Gegensatz dazu war das Verhältnis von *Methanoculleus* ($1,6\text{-}2,8 \times 10^9$ Zellen/g FM) zu *Methanosarcina* ($2\text{-}8 \times 10^9$ Zellen/g FM) in Anlage C ausgewogen, obwohl in der DGGE deutlich mehr Signale dem Genus *Methanosarcina* zuzuordnen waren.

In Übereinstimmung mit den Resultaten der qPCR konnten auch mit Hilfe der CARD-FISH in Anlage B etwas höhere Verhältnisse von Bacteria zu Archaea von 6:1 bis 10:1 (Vorbehandlung mit Pectinex) bzw. 6:1 bis 9:1 (Vorbehandlung mit Tween80) ermittelt werden, als in Anlage C (2:1 bis 3:1 mit Pectinex bzw. 3:1 bis 5:1 mit Tween80) (Abbildung 34). Methanosarcinen konnten nur in Proben der Anlage C beobachtet werden. Die Hybridisierbarkeit in den Proben der Anlagen B und C deutlich besser als in Anlage A, sodass wesentlich weniger falsch-positive Signale zu beobachten waren.

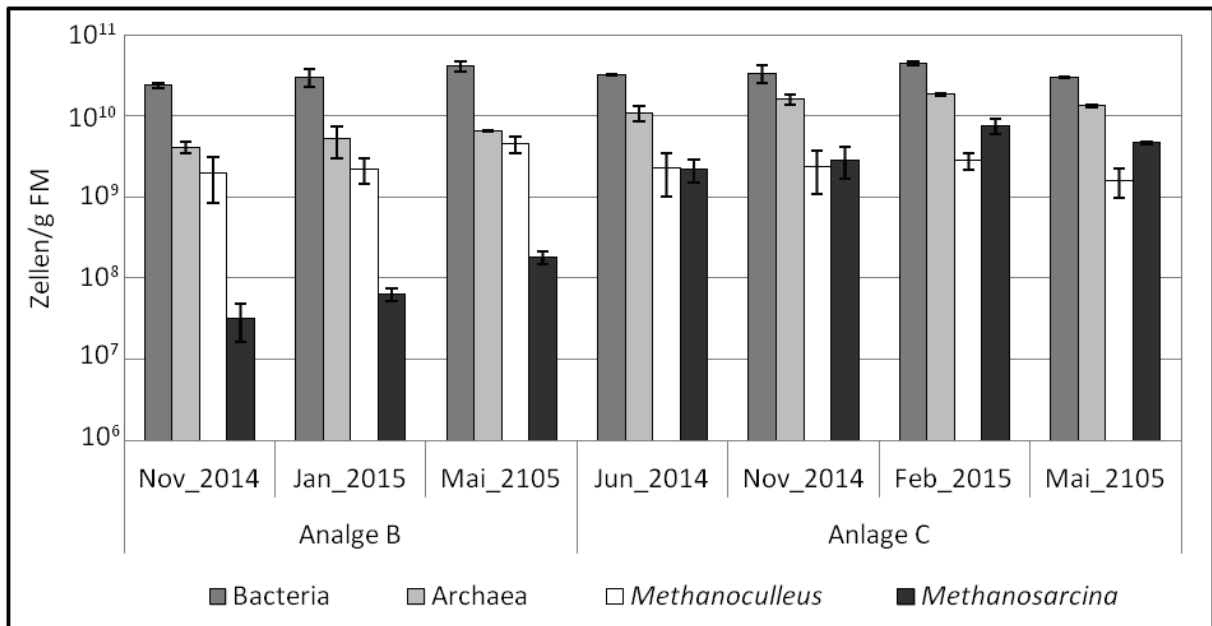


Abbildung 33: Zellzahlen der Bacteria, Archaea sowie der methanogenen Genera *Methanoculleus* und *Methanosarcina* in Anlage B.

Die mikrobiellen Abundanzen (Zellzahl/g FM) wurden aus den mittels qPCR bestimmten 16S-Kopienzahlen berechnet. Die Standardabweichungen wurden aus mindestens sechs Replikaten bestimmt.

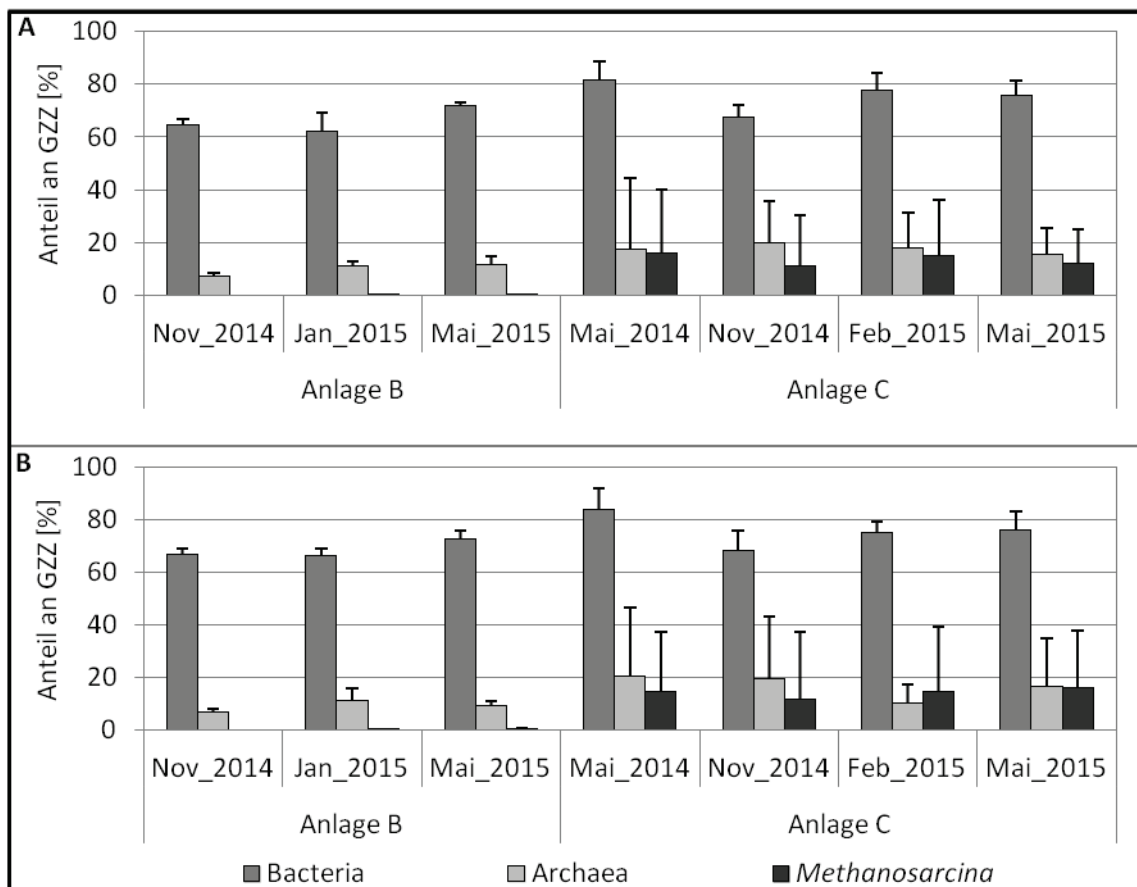


Abbildung 34: Relative Abundanzen der Bacteria, Archaea und *Methanosarcinales* in den Anlagen B und C.

Nach Vorbehandlung der Proben mit Pectinex (A) bzw. Tween80 (B) wurden die Zellen unter Verwendung der CARD-FISH mit den Sonden EUB I-III (Bacteria), A915 (Archaea) und MSMX860 (*Methanosarcinales*) hybridisiert. Die Berechnung der Standardabweichung erfolgte aus mindestens fünf Einzelzählungen von insgesamt mindestens 400 Zellen (Bacteria und Archaea) bzw. mindestens zehn Einzelzählungen (*Methanosarcinales*).

Zusätzlich wurde die Diversität in den Anlagen B und C beispielhaft jeweils mit der Probe vom November 2014 mittels 454-Amplikonsequenzierung analysiert. Dabei wurden die 6981 (B) bzw. 11436 (C) Sequenzen in 82 bzw. 105 OTUs eingeordnet, was jeweils einer Abdeckung von über 99 % entspricht (Tabelle 40). Auch bei diesen Anlagen zeigten die *rarefaction*-Kurven eine deutliche Verringerung des Anstiegs bereits bei unter 500 Sequenzen (Abbildung 35), was auf eine gute Abdeckung der Diversität in den Proben durch die durchgeführte Analyse hindeutet. Mit Hilfe der Chao1- und ACE-Indices wurde jedoch eine größere zu erwartende Anzahl an OTUs berechnet, als tatsächlich in den Proben gefunden wurde.

Tabelle 40: Durch Archaea-spezifische 454-Amplikonsequenzierung erfasste Anzahl der Sequenzen und OTUs sowie Diversitätsindices der Anlagen B und C.

	Anzahl Sequenzen	Abdeckung („coverage“) [%]	Anzahl OTUs	inverser Simpson-Index	Chao1 (Konfidenz- Intervall)	ACE (Konfidenz- Intervall)
Anlage B Nov_2014	6981	99,2	82	2,1	275 (167-516)	547 (397-768)
Anlage C Nov_2014	11436	99,3	105	2,9	378 (240-658)	381 (252-623)

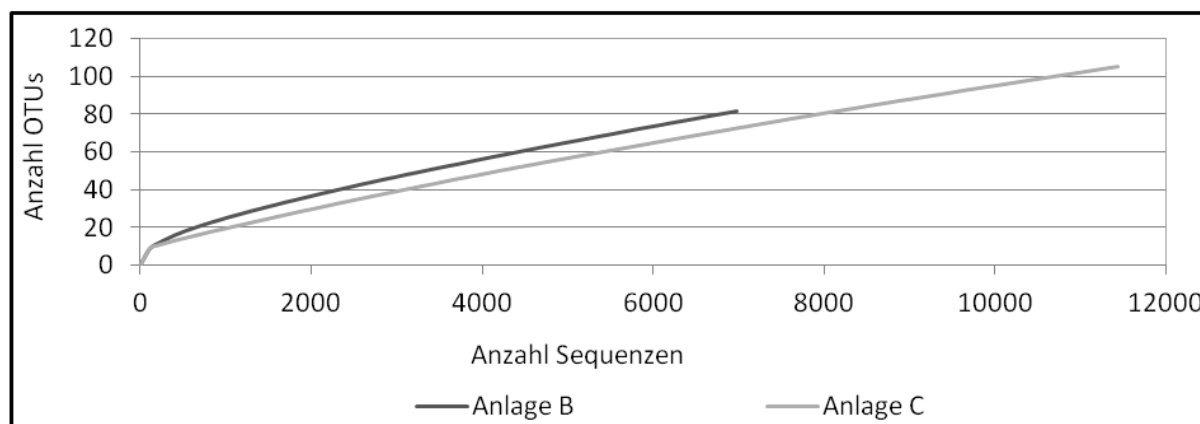


Abbildung 35: Aus der Archaea-spezifischen 454-Amplikonsequenzierung resultierende *rarefaction*-Kurven der Anlagen B und C.

Die *rarefaction*-Kurven wurden aus der Anzahl der OTUs mit einer Sequenz-Dissimilarität von $\leq 3\%$ pro Anzahl der Sequenzen berechnet.

In beiden Anlagen wurden deutlich mehr Genera detektiert, als in Anlage A. Die große Mehrzahl der Sequenzen ($> 99,7\%$) aus Anlage B konnten mit Hilfe der RDP-Klassifizierung dem Phylum der *Euryarchaeota* zugeordnet werden. Dabei war der Genus *Methanoculleus* mit $\approx 67\%$ aller Sequenzen dominierend (Abbildung 36 A), was mit den Resultaten der DGGE und qPCR übereinstimmt. Zusätzlich konnten 9% *Methanomassiliicoccus* detektiert werden, die durch die bisher dargestellte Methodik noch nicht erfasst wurden. Außerdem konnten in Anlage B $\approx 18\%$ aller

Sequenzen der Familie der *Methanosarcinaceae* zugeordnet werden. Diese konnten mittels RDP keinem Genus eindeutig zugeordnet werden und machen den Hauptteil der auf Genus-Ebene nicht klassifizierbaren Sequenzen in Abbildung 36 A aus. Mit Hilfe der Silva-Taxonomie wurden diese OTUs den *Methanimicrococcus* zugeordnet (Daten nicht gezeigt). Mit 2,3 % (*Methanobacterium*) bzw. 1,6 % (*Methanobrevibacter*) konnten Organismen der Ordnung *Methanobacteriales* nur in geringer Zahl nachgewiesen werden. Außerdem wurden eine Reihe weiterer Genera identifiziert, die jedoch mit einer relativen Abundanz von unter 1 % keine wesentliche Rolle im Biogasprozess zu spielen scheinen (Abbildung 36 A).

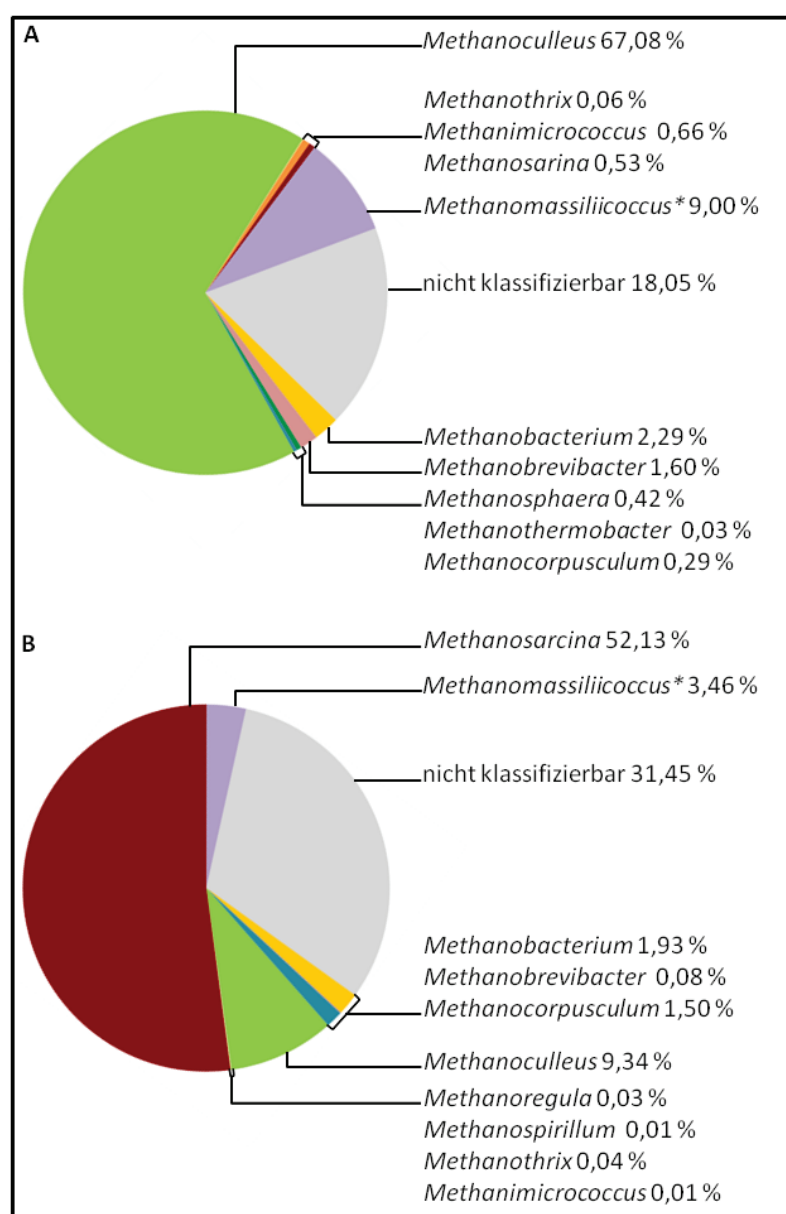


Abbildung 36: Durch Archaea-spezifische 16S-Amplikonsequenzierung bestimmte relative Abundanzen der einzelnen Genera in den Anlagen B und C.

Dargestellt sind die Anteile der mittels RDP-Taxonomie klassifizierten Sequenzen aus Anlage B (A) und C (B) an der gesamt-Anzahl der Sequenzen auf Genus-Ebene. *: Aufgrund der höheren Konfidenz erfolgte die Zuordnung mit Hilfe des RDP-Classifizier.

In Anlage C waren lediglich ca. 70 % aller Sequenzen dem Phylum der *Euryarchaeota* zuzuordnen. Die verbleibenden 30 % konnten mittels RDP nicht klassifiziert werden, während sie

anhand der Silva-Taxonomie den *Crenarchaeota* (Miscellaneous-Crenarchaeotic-Gruppe) zugeordnet wurden. Mit Hilfe der 454-Amplikonsequenzierung konnte demnach in Anlage C ein weiteres archaeelles Phylum detektiert werden, dass mit der bisher vorgestellten Analytik noch nicht erfasst werden konnte. Der vergleichsweise hohe Anteil der Crenarchaeota deutet dabei auf eine wichtige Rolle dieser Organismengruppe in Anlage C hin. Dominierender Genus in dieser Anlage war, übereinstimmend in beiden taxonomischen Zuordnungen, *Methanosarcina* mit $\approx 52\%$ aller Sequenzen (Abbildung 36 B). Mit einer relativen Abundanz von $\approx 9\%$ aller Sequenzen war *Methanoculleus* der zweithäufigste Genus dieser Anlage. Des Weiteren konnten $\approx 3,5\%$ *Methanomassiliicoccus*, $\approx 2\%$ *Methanobacterium* und $\approx 1,5\%$ *Methanocorpusculum* nachgewiesen werden. Weitere Genera waren mit einer relativen Abundanz unter 1% zu vernachlässigen.

3.2.3 Archaeelle Biozönose der Anlagen KA und KL

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zusätzlich zwei weitere Biogasanlagen untersucht, die, anders als die Anlagen A, B und C, ohne weitere enzymatische Zusätze zur Prozessoptimierung betrieben werden. Anlage KL ist dabei in prozesstechnischen Parametern (siehe Tabelle 2) den Anlagen A, B und C sehr ähnlich und wird ebenfalls mit Maissilage und Rindergülle beschickt (siehe Tabelle 3). Daraus ergibt sich auch, dass der durchschnittliche Wassergehalt in den Proben in Anlage KL ($93,2\%$) nur geringfügig höher ist, als in den Anlagen A ($90,0 \pm 1,5\%$), B ($88,9 \pm 1,8\%$) und C ($88,7 \pm 4,7\%$). Die Acetatkonzentration im Biogasschlamm der Anlage KL ist mit 57 mg/l im Vergleich zu den Anlagen A, B und C jedoch deutlich geringer (A: $708 \pm 707\text{ mg/l}$; B: $350 \pm 131\text{ mg/l}$; C: $306 \pm 210\text{ mg/l}$; Daten zur Verfügung gestellt von Herrn Heiko Herrling, Technische Universität Dresden).

Im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Biogasanlagen zeichnet sich Anlage KA durch ein etwa fünffaches Reaktorvolumen aus. Außerdem wird diese mit eingedicktem, kommunalen Abwasserschläm als Substrat betrieben. Der durchschnittliche Wassergehalt des Fermentermaterials dieser Anlage liegt mit $96,0 \pm 0,3\%$ etwas höher als in den anderen Anlagen. Trotz des unterschiedlichen Reaktorbetriebs ist die Acetatkonzentration im Biogasschlamm der Anlage KA (KA: $66 \pm 9\text{ mg/l}$) vergleichbar mit der in Anlage KL.

Die archaeellen DGGE-Profile der Anlagen KA und KL waren sich sehr ähnlich und in beiden Anlagen konnten viele Hauptsignale gleichermaßen detektiert werden (Abbildung 37). Das deutet auf eine sehr vergleichbare archaeelle Biozönose in den Anlagen KA und KL hin, die möglicherweise in der ähnlichen Acetatkonzentration begründet liegt. Die archaeelle Zusammensetzung der Anlagen KA und KL scheint sich jedoch von der in Anlage A zu unterscheiden, da hier nur wenige gleiche Signale detektiert werden konnten. Das DGGE-Muster der parallelen Faultürme F1 und F2 der Anlage KA war

identisch. Da auch das DGGE-Profil der Probe Jun_2014_F1 dem der vorherigen Proben glich, kann von einer stabilen archaeellen Biozönose in diesem Zeitraum ausgegangen werden.

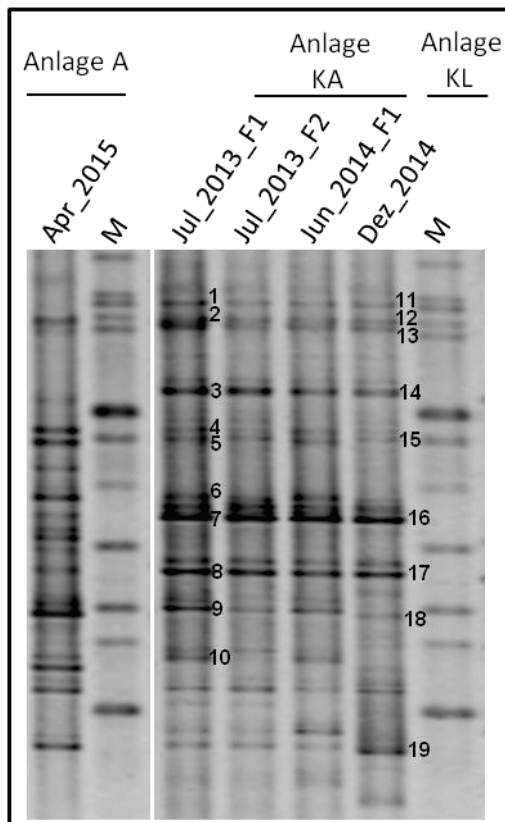


Abbildung 37: Archaeelle DGGE-Profile der Anlagen KA und KL im Vergleich zu Anlage A.

Mit Hilfe der Primer Parch340f und A915r_GC wurden die spezifischen 16S rDNA Fragmente amplifiziert und anschließend in einem 40-70 % denaturierenden Gradienten gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nummerierte Signale konnten durch Vergleich mit einer entsprechenden Klonbank taxonomisch zugeordnet werden. M: Marker.

Die hohe Ähnlichkeit in der archaeellen Biozönose der Anlagen KA und KL zeigt sich auch in den Ergebnissen der Klonierung. Dabei konnten in beiden Anlagen fast alle Signale dem Genus *Methanothrix*² zugeordnet werden (Tabelle 41, Tabelle 42). Als am nächsten verwandter Organismus wurde jeweils *Methanosaeta concilii* Stamm GP6 identifiziert. Je zwei DGGE-Signale konnten außerdem dem Genus *Methanoculleus* zugeordnet werden.

Tabelle 41: Phylogenetische Zuordnung archaeeller DGGE-Signale mittels spezifischer Klone aus Anlage KA.

Signal	Identifikation durch	Klassifikation nach RDP [Konfidenz]	Nächster Verwandte nach NCBI [Sequenzidentität]
1-3, 6, 7	Klon 3	<i>Methanomicrobia</i> [100 %] <i>Methanosarcinales</i> [55 %]	<i>Methanosaeta concilii</i> Stamm GP6 [89 %] ²
	Klon 5	<i>Methanomicrobia</i> [100 %] <i>Methanomicrobiales</i> [53 %]	<i>Methanosaeta concilii</i> Stamm GP6 [91 %] ²
	Klon 18	<i>Methanothrix</i> [100 %]	<i>Methanosaeta concilii</i> Stamm GP6 [95 %] ²
4, 5, 10	Klon 4	<i>Methanothrix</i> [100 %]	<i>Methanosaeta concilii</i> Stamm GP6 [98 %] ¹
	Klon 9	<i>Methanothrix</i> [100 %]	<i>Methanosaeta concilii</i> Stamm GP6 [99 %] ¹

²In der Klassifizierung nach NCBI wird *Methanothrix* noch als *Methanosaeta* bezeichnet.

Tabelle 41 (Fortsetzung): Phylogenetische Zuordnung archaeeller DGGE-Signale mittels spezifischer Klone aus Anlage KA.

Signal	Identifikation durch	Klassifikation nach RDP [Konfidenz]	Nächster Verwandte nach NCBI [Sequenzidentität]
8, 9	Klon 4	<i>Methanothrix</i> [100 %]	<i>Methanosaeta concilii</i> Stamm GP6 [98 %] ¹
	Klon 9	<i>Methanothrix</i> [100 %]	<i>Methanosaeta concilii</i> Stamm GP6 [99 %] ¹
	Klon 16	<i>Methanoculleus</i> [100 %]	<i>Methanoculleus bourgensis</i> Stamm MS2 ^T [99 %] ¹
*	Klon 7	<i>Methanothrix</i> [100 %]	<i>Methanosaeta concilii</i> Stamm GP6 [98 %] ¹
	Klon 13	<i>Methanolinea</i> [99 %]	<i>Methanolinea tarda</i> Stamm NOBI-1 [89 %] ²
	Klon 15	Archaea [100 %] <i>Crenarchaeota</i> [82 %]	<i>Thermocladium modestius</i> Stamm IC-125 [83 %] ³

Die Nummerierungen der DGGE-Signale sind der Abbildung 37 zu entnehmen.

*Diese Klone stimmen mit keinem DGGE-Signal überein.

¹Es wurden nur Organismen einbezogen, deren gesamte Genom-Sequenz bekannt ist.

²Durch Einbeziehen von Organismen, deren 16S rDNA Sequenz, aber nicht das Genom bekannt sind, konnte kein näher verwandter Organismus identifiziert werden.

³Identifikation lediglich durch eine bekannte 16S rDNA-Sequenz; das Genom ist derzeit noch nicht bekannt.

Tabelle 42: Taxonomische Einordnung archaeeller DGGE-Signale mit Hilfe spezifischer Klone aus Anlage KL.

Signal	Identifikation durch	Klassifikation nach RDP [Konfidenz]	Nächster Verwandte nach NCBI [Sequenzidentität] ¹
11-17	Klon 4	<i>Methanothrix</i> [100 %]	<i>Methanosaeta concilii</i> Stamm GP6 [98 %]
	Klon 13	<i>Methanothrix</i> [100 %]	<i>Methanosaeta concilii</i> Stamm GP6 [98 %]
	Klon 15	<i>Methanothrix</i> [100 %]	<i>Methanosaeta concilii</i> Stamm GP6 [98 %]
	Klon 18	<i>Methanothrix</i> [100 %]	<i>Methanosaeta concilii</i> Stamm GP6 [98 %]
18	Klon 10	<i>Methanoculleus</i> [100 %]	<i>Methanoculleus bourgensis</i> Stamm MS2 ^T [99 %]
	Klon 12	<i>Methanothrix</i> [100 %]	<i>Methanosaeta concilii</i> Stamm GP6 [97 %]
19	Klon 10	<i>Methanoculleus</i> [100 %]	<i>Methanoculleus bourgensis</i> Stamm MS2 ^T [99 %]

Die Nummerierungen der DGGE-Signale sind der Abbildung 37 zu entnehmen.

¹Es wurden nur Organismen einbezogen, deren gesamte Genom-Sequenz bekannt ist.

Anhand der *Methanobacteriales*-DGGE-Profile konnte in den Anlagen KA und KL nur eine sehr limitierte Diversität von Organismen der Ordnung *Methanobacteriales* beobachtet werden, was sich in der geringen Anzahl an Signalen widerspiegelt. Anders als bei der allgemeinen Archaea-DGGE zeigte sich hier ein deutlicher Unterschied zwischen den DGGE-Profilen der Anlage KA und KL. Die Signale der Anlage KA gehörten dabei zum einen den Genera *Methanobrevibacter* (Abbildung 38, Signal 1; nächster Verwandter Organismus: *Methanobrevibacter smithii*) und *Methanobacterium* (Abbildung 38, Signal 3) an (Tabelle 43). Das Signal 2 konnte nicht eindeutig klassifiziert werden, wies aber 97 % Sequenzidentität mit anderen, bisher nicht kultivierten Archaea auf, die bereits in Biogasanlagen gefunden wurden (135).

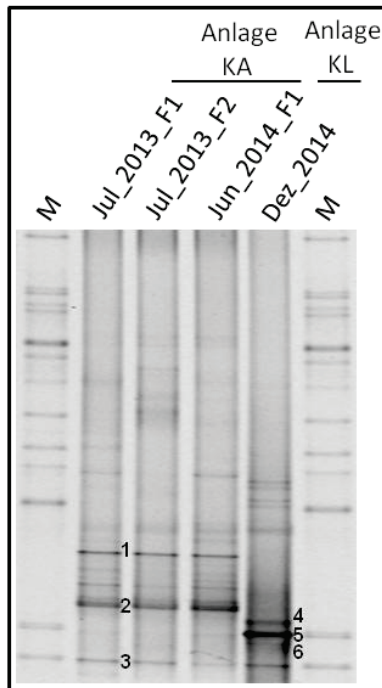


Abbildung 38: *Methanobacteriales* spezifische DGGE-Profile der Anlagen KA und KL.

Nach Amplifikation mit Hilfe der Primer Mbt857f_GC und Mbt1196r wurden die DNA-Fragmente im 40-70 %igen denaturierenden Gradienten aufgetrennt. Nummerierte Signale konnten durch Abgleich mit einer entsprechenden Klonbank identifiziert werden. M: Marker.

Im Gegensatz dazu konnten alle Signale der Anlage KL dem Genus *Methanobacterium* zugeordnet werden (Tabelle 44). Auch weitere Klone, die nicht im DGGE-Profil der Anlage zu detektieren sind, gehörten diesem Genus an, wenn auch nicht bei jedem Klon eine eindeutige taxonomische Einordnung möglich war.

Tabelle 43: Identifikation *Methanobacteriales*-spezifischer DGGE-Signale mittels Klonen aus Anlage KA.

Signal	Identifikation durch	Klassifikation nach RDP	Nächster Verwandte nach NCBI [Sequenzidentität]
1	Klon 15	<i>Methanobrevibacter</i> [100 %]	<i>Methanobrevibacter smithii</i> Stämme DSM 2374, ATCC 35061 [je 100 %]
	Klon 27	<i>Methanobrevibacter</i> [100 %]	<i>Methanobrevibacter smithii</i> Stämme DSM 2374, ATCC 35061 [je 98 %] ¹
2	Klon 22	<i>Methanobacteriaceae</i> [100 %] <i>Methanobacterium</i> [94 %]	<i>Methanobacterium</i> sp. Stamm SMA-27; <i>Methanobacterium lacus</i> Stamm AL-21 [je 95 %] ²
	Klon 26	<i>Methanobacteriaceae</i> [100 %] <i>Methanobacterium</i> [62 %]	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i> Stamm ANOR1; <i>Methanobacterium</i> sp. Stamm SMA-27; <i>Methanobacterium lacus</i> Stamm AL-21 [je 91 %] ²

Tabelle 43 (Fortsetzung): Identifikation *Methanobacteriales*-spezifischer DGGE-Signale mittels Klonen aus Anlage KA.

Signal	Identifikation durch	Klassifikation nach RDP	Nächster Verwandte nach NCBI [Sequenzidentität]
3	Klon 3	<i>Methanobacterium</i> [100 %]	<i>Methanobacterium formicicum</i> Stämme BRM9, DSM1535; <i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1; <i>Methanobacterium paludis</i> Stamm SWAN1 [je 99 %]
	Klon 18	<i>Methanobacterium</i> [100 %]	<i>Methanobacterium formicicum</i> Stämme BRM9, DSM1535; <i>Methanobacterium</i> sp. Stamm MB1; <i>Methanobacterium paludis</i> Stamm SWAN1 [je 99 %]
*	Klon 2	<i>Methanobacteriaceae</i> [100 %] <i>Methanobacterium</i> [95 %]	<i>Methanobacterium formicicum</i> Stämme BRM9, DSM1535 [je 92 %] ²
	Klon 10	<i>Methanobacteriaceae</i> [100 %] <i>Methanobrevibacter</i> [87 %]	<i>Methanobacterium paludis</i> Stamm SWAN1; <i>Methanobrevibacter milleraei</i> Stamm SM9; <i>Methanobacterium formicicum</i> Stämme BRM9, DSM1535 [je 95 %] ²
	Klon 11	<i>Methanobacteriaceae</i> [100 %] <i>Methanobrevibacter</i> [96 %]	<i>Methanobrevibacter smithii</i> Stämme DSM 2374, ATCC 35061 [je 91 %] ²
	Klon 13	<i>Methanobacteriaceae</i> [100 %] <i>Methanobacterium</i> [76 %]	<i>Methanobacterium beijingense</i> Stamm 8-2 [86 %] ³
	Klon 19	<i>Methanobacteriaceae</i> [100 %] <i>Methanobrevibacter</i> [53 %]	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i> Stamm ANOR1 [90 %] ²

Die Nummerierungen der DGGE-Signale sind der Abbildung 38 zu entnehmen.

*Diese Klone stimmen mit keinem DGGE-Signal überein.

¹Es wurden nur Organismen einbezogen, deren gesamte Genom-Sequenz bekannt ist

²Durch Einbeziehen von Organismen, deren 16S rDNA Sequenz, aber nicht das Genom bekannt sind, konnte kein näher verwandter Organismus identifiziert werden

³Identifikation lediglich durch eine bekannte 16S rDNA-Sequenz; das Genom ist derzeit noch nicht bekannt

Tabelle 44: Taxonomische Zuordnung *Methanobacteriales*-spezifischer DGGE-Signale mit Hilfe von Klonen aus Anlage KL.

Signal	Identifikation durch	Klassifikation nach RDP	Nächster Verwandte nach NCBI [Sequenzidentität] ¹
4-6	Klon 5	<i>Methanobacterium</i> [98 %]	<i>Methanobacterium</i> sp. Stamm SMA-27; <i>Methanobacterium lacus</i> Stamm AL-21; <i>Methanobacterium formicicum</i> Stämme BRM9, DSM1535 [je 99 %]
	Klon 6	<i>Methanobacterium</i> [97 %]	<i>Methanobacterium</i> sp. Stamm SMA-27; <i>Methanobacterium lacus</i> Stamm AL-21; <i>Methanobacterium formicicum</i> Stämme BRM9, DSM1535 [je 99 %]

Tabelle 44 (Fortsetzung): Taxonomische Zuordnung *Methanobacteriales*-spezifischer DGGE-Signale mit Hilfe von Klonen aus Anlage KL.

Signal	Identifikation durch	Klassifikation nach RDP	Nächster Verwandte nach NCBI [Sequenzidentität] ¹
*	Klon 3	<i>Methanobacteriaceae</i> [100 %] <i>Methanobacterium</i> [96 %]	<i>Methanobacterium</i> sp. Stamm SMA-27; <i>Methanobacterium lacus</i> Stamm AL-21 [je 99 %]
	Klon 7	<i>Methanobacteriaceae</i> [100 %] <i>Methanobacterium</i> [92 %]	<i>Methanobacterium</i> sp. Stamm SMA-27; <i>Methanobacterium lacus</i> Stamm AL-21 [je 99 %]
	Klon 10	<i>Methanobacterium</i> [100 %]	<i>Methanobacterium</i> sp. Stamm SMA-27; <i>Methanobacterium lacus</i> Stamm AL-21; <i>Methanobacterium formicum</i> Stämme BRM9, DSM1535 [je 99 %]
	Klon 13	<i>Methanobacteriaceae</i> [100 %] <i>Methanobacterium</i> [87 %]	<i>Methanobacterium</i> sp. Stamm SMA-27; <i>Methanobacterium lacus</i> Stamm AL-21 [je 99 %]

Die Nummerierungen der DGGE-Signale sind der Abbildung 38 zu entnehmen.

*Diese Klone stimmen mit keinem DGGE-Signal überein.

¹Es wurden nur Organismen einbezogen, deren gesamte Genom-Sequenz bekannt ist.

Um einen Vergleich der mikrobiellen Abundanzen mit den Anlagen A, B und C zu ermöglichen, wurden auch die Proben der Anlagen KA und KL mit Hilfe der qPCR untersucht (Abbildung 39). Dabei wurden in Anlage KA mit $4,8 \times 10^9 \pm 2,5 \times 10^7$ Zellen/g FM etwas geringere bakterielle Zellzahlen ermittelt als in Anlage KL ($2,6 \times 10^{10} \pm 3 \times 10^9$ Zellen/g FM). Die Anzahl der Archaea betrug in Anlage KA $4,1 \times 10^9 \pm 4,3 \times 10^7$ Zellen/g FM und in Anlage KL $5,7 \times 10^9 \pm 9,4 \times 10^8$ Zellen/g FM, was in beiden Anlagen in einem Bacteria:Archaea Verhältnis von 5:1 resultiert. Organismen des Genus *Methanoculleus* machten in beiden Anlagen einen Anteil von ca. 25-35 % der archaeellen Populationen aus, während die Methanosarcinen mit einem Anteil von unter 5 % der gesamten Archaea zu diesem Untersuchungszeitpunkt keine wesentliche Rolle in diesen beiden Biogasanlagen zu spielen schienen.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der qPCR wurden in den Proben der Anlage KA durch Hybridisierung mit markierten Oligonukleotidsonden Bacteria:Archaea Verhältnisse von 5:1 bis 8:1 ermittelt (Abbildung 40). Allerdings konnten in Anlage KL lediglich ca. 4 % der gesamten hybridisierten Zellen den Archaea zugeordnet werden, was deutlich unter dem durch qPCR bestimmten archaeellen Anteil liegt. Außerdem konnten in beiden Anlagen auch einige wenige Signale (unter 1 % der GZZ) mit der Sonde MSMX860 (spezifisch für *Methanosarcinales*) detektiert werden. Dabei kann aufgrund deren stäbchenförmiger Morphologie ausgeschlossen werden, dass es sich um *Methanosarcina* handelt. Es ist wahrscheinlich, dass diese Signale Zellen des Genus *Methanothrix* zuzuordnen sind. Allerdings wäre dann aufgrund der Dominanz von *Methanothrix*-

Signalen in der DGGE eine wesentlich höhere Anzahl hybridisierter Zellen mit dieser Sonde zu erwarten gewesen.

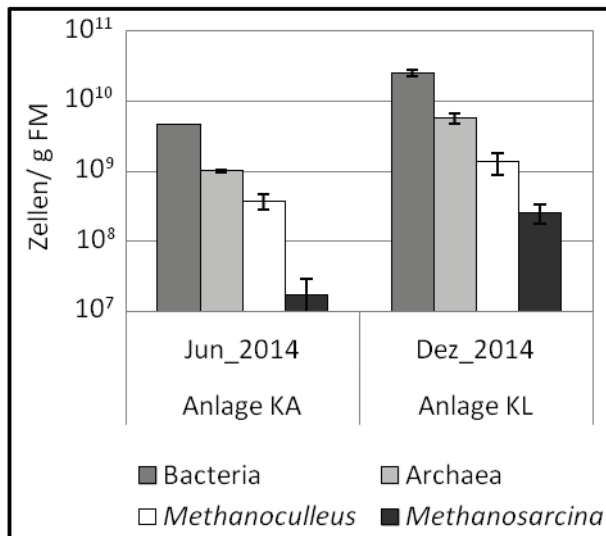


Abbildung 39: Mittels qPCR ermittelte Abundanzen der Bacteria, Archaea sowie der Genera *Methanoculleus* und *Methanosarcina* in den Anlagen KA und KL.

Aus den mittels qPCR bestimmten 16S-rDNA Kopienzahlen wurden die Zellzahlen pro g Frischmasse (FM) bestimmt. Die Standardabweichungen wurden aus mindestens sechs Replikaten errechnet.

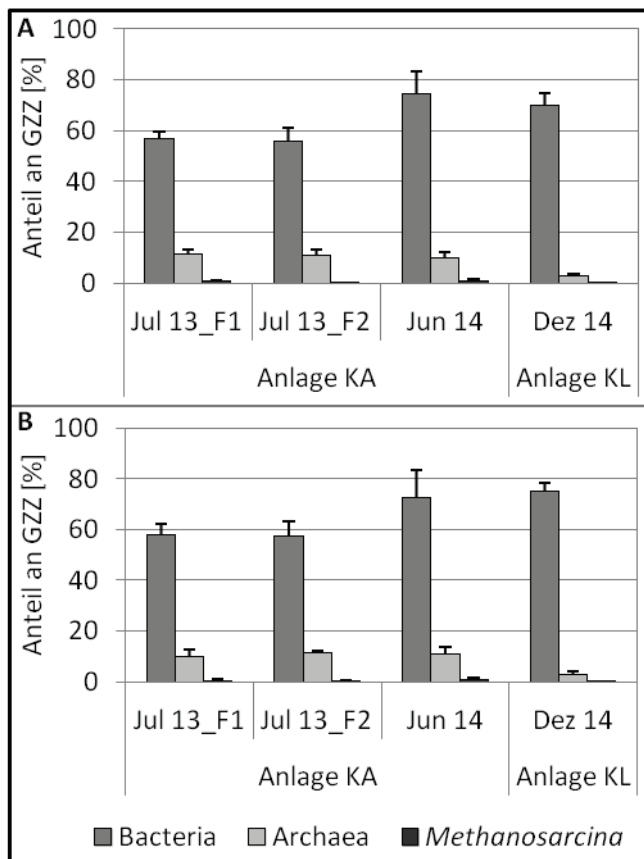


Abbildung 40: Mittels CARD-FISH bestimmte relative Abundanzen der Bacteria, Archaea und *Methanosarcinales* in den Anlagen KA und KL.

Die Proben wurden mit Pectinex (A) bzw. Tween80 (B) vorbehandelt und die Zellen anschließend unter Verwendung der CARD-FISH mit den Sonden EUB I-III (Bacteria), A915 (Archaea) und MSMX860 (*Methanosarcinales*) hybridisiert. Die Berechnung der Standardabweichung erfolgte aus mindestens fünf Einzelzählungen von insgesamt mindestens 400 Zellen (Bacteria und Archaea) bzw. mindestens zehn Einzelzählungen (*Methanosarcinales*).

Wie bereits die Anlagen A, B und C wurden auch die Anlagen KA und KL mittels 454-Amplikonsequenzierung untersucht. Dabei konnten die vorhandenen 7196 (KA) bzw. 5425 (KL) Sequenzen jeweils 66 verschiedenen OTUs zugeordnet werden, was einer Abdeckung von 99,5 % (KA)

bzw. 99,1 % (KL) entspricht (Tabelle 45). Die *rarefaction*-Kurven dieser Proben zeigten eine deutliche Verringerung des Anstiegs (Abbildung 41). Dennoch deuteten der Chao1- und ACE-Index darauf hin, dass die tatsächliche Anzahl der in beiden Proben vorhandenen OTUs die der durch die Analyse ermittelten OTUs deutlich übersteigt. Anhand der Diversitätsindices kann von einer höheren Diversität in Anlage KL ausgegangen werden.

Tabelle 45: Durch Archaea-spezifische 454-Amplikonsequenzierung erfasste Anzahl der Sequenzen und OTUs sowie Diversitätsindices der Anlagen KA und KL.

	Anzahl Sequenzen	Abdeckung („coverage“) [%]	Anzahl OTUs	inverser Simpson-Index	Chao1 (Konfidenz- Intervall)	ACE (Konfidenz- Intervall)
Anlage KA Jun_2014	7196	99,5	66	3,3	172 (109-327)	266 (195-378)
Anlage KL Dez_2014	5425	99,1	66	4,5	282 (151-613)	559 (365-879)

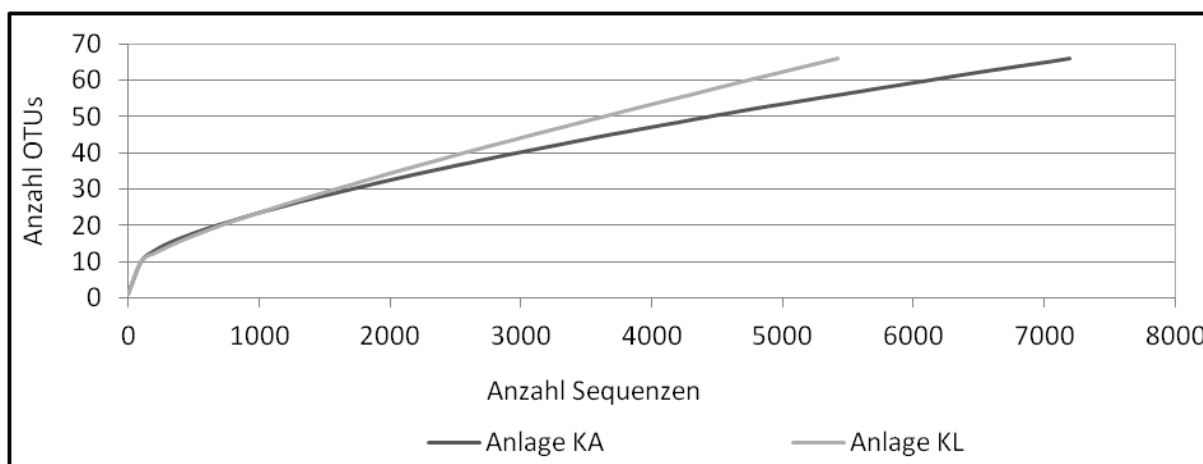


Abbildung 41: Aus der Archaea-spezifischen 454-Amplikonsequenzierung resultierende *rarefaction*-Kurven der Anlagen KA und KL.

Die *rarefaction*-Kurven wurden aus der Anzahl der OTUs mit einer Sequenz-Dissimilarität von $\leq 3\%$ pro Anzahl der Sequenzen berechnet.

In Anlage KA konnten $\approx 88\%$ aller Sequenzen dem Phylum *Euryarchaeota* zugeordnet werden. Die Mehrzahl der übrigen Sequenzen konnte mittels RDP nicht klassifiziert werden, während diese Sequenzen mit Hilfe der Silva-Klassifizierung zum Phylum der *Crenarchaeota* (Miscellaneous-Crenarchaeotic-Gruppe) zugerechnet wurden. Eine nähere taxonomische Zuordnung dieser Sequenzen war nicht möglich. Auf Genus-Ebene konnten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der DGGE und qPCR in der Anlage KA insbesondere *Methanothrix* ($\approx 22\%$ aller Sequenzen) und *Methanoculleus* ($\approx 11,5\%$ aller Sequenzen) nachgewiesen werden (Abbildung 42 A). Einen geringen Anteil machten ebenso *Methanospirillum* ($\approx 3\%$ aller Sequenzen), *Methanobacterium* und *Methanobrevibacter* (jeweils $\approx 1\%$ aller Sequenzen) aus. Andere Genera waren mit relativen

Abundanzen von weniger als 1 % vernachlässigbar. Die absolute Mehrheit der Sequenzen aus dieser Anlage ($\approx 60\%$) konnten jedoch mittels RDP nicht klassifiziert werden. Ein Großteil dieser OTUs ($\approx 80\%$) wird mit Hilfe der Silva-Klassifizierung der WCHA1-57-Klade (*Thermoplasmata*) zugeordnet. Vertreter dieser OTUs konnten bereits in anderen bisher nicht veröffentlichten Untersuchungen in Biogasanlagen gefunden werden.

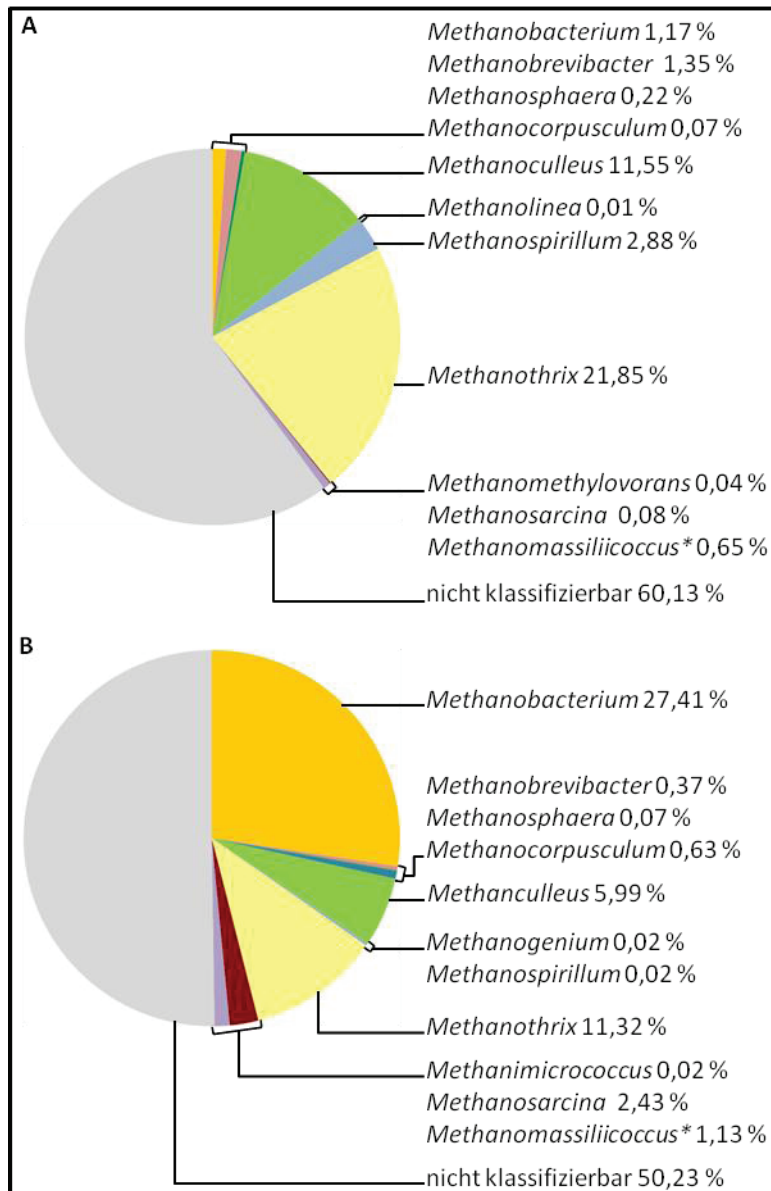


Abbildung 42: Durch Archaea-spezifische 16S-Amplikon-sequenzierung bestimmte relative Abundanzen der einzelnen Genera in den Anlagen KA und KL.

Dargestellt sind die Anteile der mittels RDP-Taxonomie klassifizierten Sequenzen aus Anlage KA (A) und KL (B) an der gesamt-Anzahl der Sequenzen auf Genus-Ebene. *: Aufgrund der höheren Konfidenz erfolgte die Zuordnung mit Hilfe des RDP-Classifizier

In der Anlage KL sind lediglich $\approx 61,5\%$ aller erhaltenen Sequenzen den *Euryarchaeota* zuzuordnen. Durch RDP werden außerdem $\approx 22\%$ aller Sequenzen als *Crenarchaeota* identifiziert. Weitere $\approx 16,5\%$ bleiben nach RDP unklassifiziert, werden aber durch Silva ebenfalls den *Crenarchaeota* (Miscellaneous-Crenarchaeotic-Gruppe) zugeordnet. Der häufigste Genus der Anlage KL ist mit $\approx 27\%$ *Methanobacterium* (Abbildung 42 B). Überraschenderweise wurden diese

Organismen nicht in der allgemeinen Archaea-DGGE und -Klonierung erfasst. Weitere abundante OTUs gehörten den Genera *Methanothrix* ($\approx 11\%$ aller Sequenzen) und *Methanoculleus* ($\approx 6\%$ aller Sequenzen) an. Des Weiteren wurden $\approx 2\%$ *Methanosarcina* und $\approx 1\%$ *Methanomassiliicoccus* gefunden. Eine Reihe weiterer OTUs waren mit einer relativen Abundanz unter 1% nicht von Bedeutung. Allerdings konnten auch in der Anlage KL ca. 50% aller Sequenzen taxonomisch nicht eindeutig zugeordnet werden. Im Gegensatz zur Anlage KA konnten in dieser Anlage nur ca. 23% dieser OTUs der WCHA1-57-Klade (*Thermoplasmata*) zugeordnet werden.

Anhand der 454-Amplikonsequenzierung zeigt sich, dass die Anlagen KA und KL nicht, wie durch die DGGE annehmbar, von *Methanothrix* dominiert werden. Vielmehr kommen, wie bereits in Anlage C, auch *Crenarchaeota* in verhältnismäßig großer Zahl vor.

3.3 Bakterielle Diversität in verschiedenen Biogasanlagen

3.3.1 Bakterielle Biozönose während des Normalbetriebes

Um zusätzlich zur archaeellen Biozönose auch einen Einblick in die Zusammensetzung der bakteriellen Population zu gewinnen, wurde aus jeder Anlage je eine Probe ausgewählt und mit Hilfe der 454-Amplikonsequenzierung untersucht. Die dabei nach der Qualitätskontrolle verbleibenden Sequenzanzahlen sowie die Anzahlen der daraus ermittelten OTUs sind in Tabelle 46 zusammengefasst.

Tabelle 46: Durch Bacteria-spezifische 454-Amplikonsequenzierung erfasste Anzahl der Sequenzen und OTUs sowie Diversitätsindices der untersuchten Anlagen.

	Anzahl Sequenzen	Abdeckung („coverage“) [%]	Anzahl OTUs	inverser Simpson- Index	Chao1 (Konfidenz- Intervall)	ACE (Konfidenz- Intervall)
Anlage A Feb_2015	7544	97,2	490	22,5	841 (732-999)	974 (890-1077)
Anlage B Nov_2014	7330	96,4	518	19,9	1084 (914-1325)	1369 (1245-1512)
Anlage C Nov_2014	5346	95,3	474	18,0	972 (822-1187)	1435 (1297-1597)
Anlage KA Jun_2014	6864	94,8	791	50,4	1353 (1213-1539)	1647 (1530-1781)
Anlage KL Dez_2014	6169	94,9	605	13,0	1323 (1121-1604)	1679 (1537-1843)

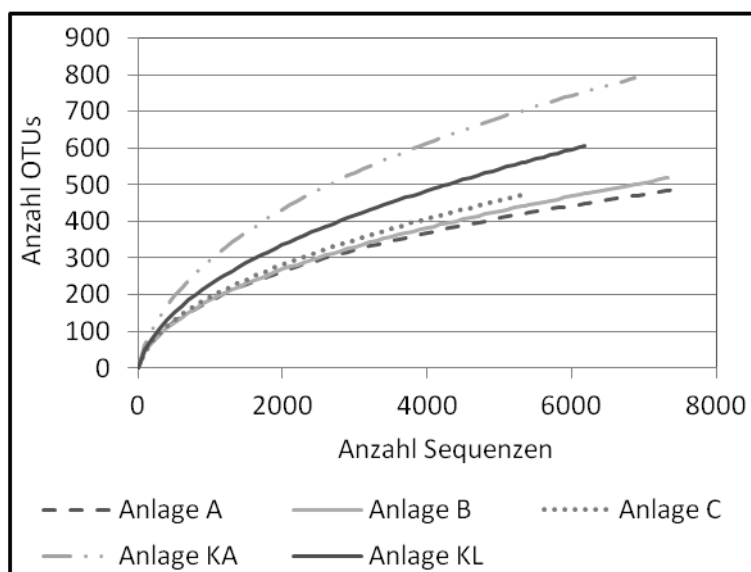


Abbildung 43: Aus der Bacteria-spezifischen 454-Amplikonsequenzierung resultierende *rarefaction*-Kurven der verschiedenen Anlagen.

Die *rarefaction*-Kurven wurden aus der Anzahl der OTUs mit einer Sequenz-Dissimilarität von $\leq 3\%$ pro Anzahl der Sequenzen berechnet. Untersuchte Proben: Anlage A Februar 2015; Anlage B November 2014; Anlage C November 2014; Anlage KA Juni 2014; Anlage KL Dezember 2014.

Insgesamt konnte mit dieser Analyse in den Proben eine Abdeckung von $\approx 95\text{--}97\%$ erreicht werden. Die *rarefaction*-Kurven aller Proben erreichten dabei noch kein Plateau, zeigten jedoch bereits einen abflachenden Kurvenverlauf (Abbildung 43). Zudem deutet der Chao1- und ACE-Index auf eine etwa zwei- bis dreifach höhere Anzahl an OTUs in den Proben hin, als mit der Analyse tatsächlich bestimmt wurden. Der inverse Simpson-Index ist in den Anlagen A, B und C vergleichbar. In der Anlage KA ist er jedoch deutlich größer, was auf ein höheres Maß an Diversität in dieser Probe schließen lässt.

Die Zusammensetzungen der einzelnen bakteriellen Phyla waren in den Anlagen A, B, C und KL sehr ähnlich. Dominierende Ordnung war dabei die *Firmicutes* ($\approx 74\%$ Anlagen A und C, $\approx 83\%$ Anlage B und $\approx 63\%$ Anlage KL). In Anlage KA hingegen waren nur $\approx 21\%$ aller Sequenzen dieser Ordnung zugehörig (Abbildung 44 A). Die überwiegende Mehrheit der *Firmicutes* konnte in allen Anlagen den *Clostridiales* zugeordnet werden ($\approx 46\%$ Anlage A, $\approx 37\%$ Anlage B, $\approx 46\%$ Anlage C, $\approx 58\%$ Anlage KA und $\approx 56\%$ in KL). Ca. 37-50 % der *Firmicutes* waren auf Ordnungsebene nicht näher klassifizierbar. Häufige Familien innerhalb der *Clostridiales* sind in allen Anlagen die *Ruminococcaceae* ($\approx 23\text{--}32\%$) (Abbildung 44 B). Organismen der Familie *Clostridiales_Incertae_Sedis_XI* sind mit $\approx 42\%$ besonders in Anlage KL sehr abundant. Aber auch in den Anlagen A ($\approx 12\%$), C ($\approx 27\%$) und KA ($\approx 18\%$) sind diese Organismen in großer Zahl zu finden. Die meisten OTUs, die in diese Familie eingruppiert wurden, repräsentieren den Genus *Sedimentibacter*. Zu nennen sind außerdem die *Clostridiaceae_1* (vor allem in Anlage B mit $\approx 19\%$ und C mit $\approx 16\%$), die *Lachnospiraceae* (vor allem in den Anlagen A und B mit je $\approx 8\%$) und die *Syntrophomonadaceae* (vor allem in Anlage C mit $\approx 6\%$ und Anlage KA mit $\approx 9\%$).

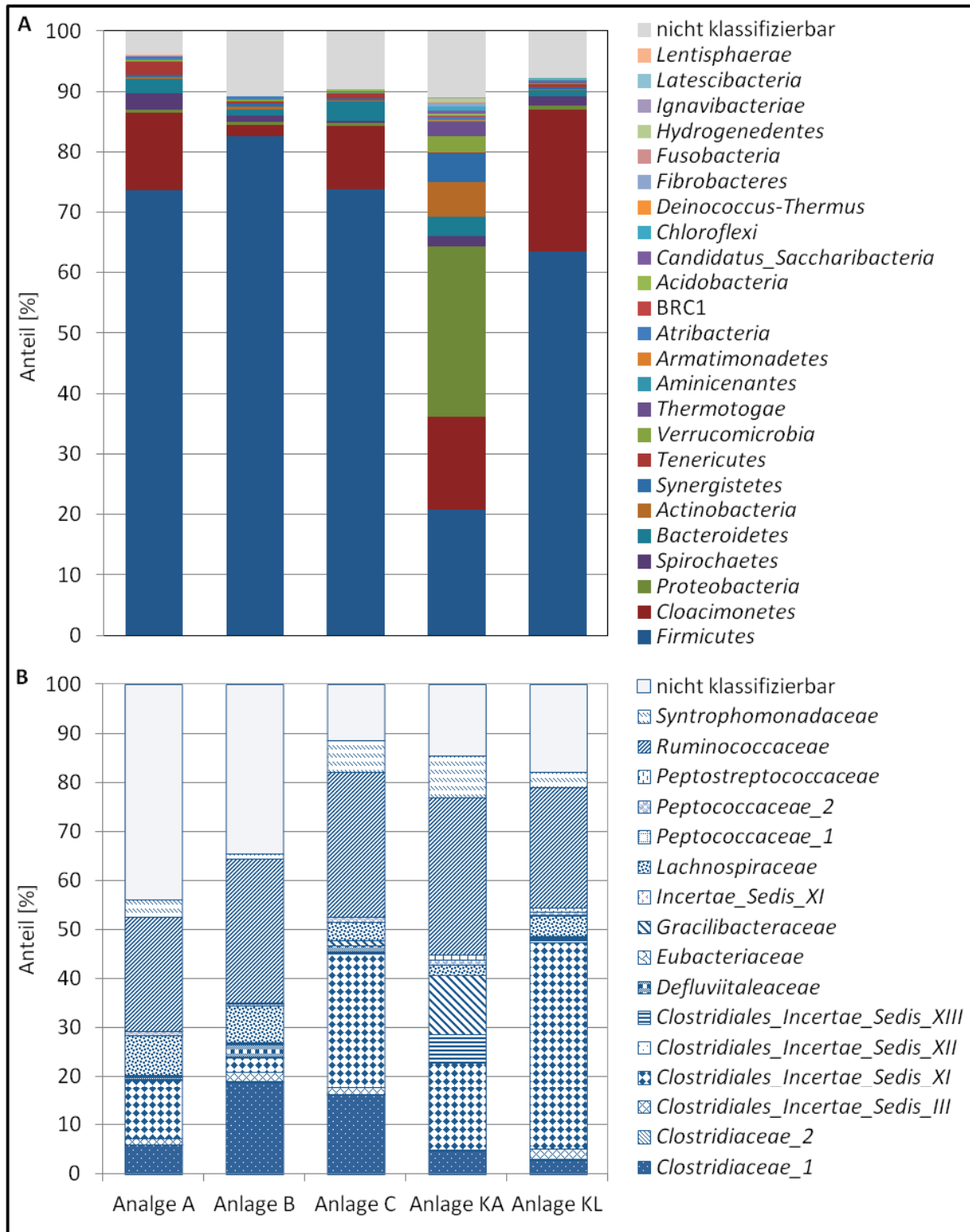


Abbildung 44: Durch Bacteria-spezifische 454-Amplikonsequenzierung bestimmte relative Abundanzen der einzelnen Taxa in den Anlagen.

Dargestellt sind die Anteile der mittels RDP-Taxonomie klassifizierten Sequenzen der Anlagen an der gesamt-Anzahl der Sequenzen auf Phylum-Ebene (A) bzw. die Anteile der einzelnen Familien an der gesamt-Zahl aller *Clostridiales* (B). Die genaue Zusammensetzung sind dem Anhang zu entnehmen (Tabelle A20, Tabelle A21).

Neben den *Firmicutes* wurden insbesondere in den Anlagen A, C, KA und KL auch Organismen des Phylums *Cloacimonetes* (je $\approx 13\%$; $\approx 10\%$, $\approx 15\%$ und $\approx 24\%$) gefunden. Bei Verwendung der

Silva-Klassifizierung werden diese OTUs den *Spirochaetes* zugeordnet. Zudem waren in Anlage KA $\approx 28\%$ aller Sequenzen den *Proteobacteria* (davon ca. 30 % *Beta*- und 41 % *Deltaproteobacteria*) und $\approx 6\%$ den *Actinobacteria* zugehörig. Weitere Phyla traten in den einzelnen Anlagen nur mit einer relativen Abundanz von unter 5 % auf.

In ihrer bakteriellen Zusammensetzung ähnelt die Anlage KL also, im Gegensatz zur Biozönose der Archaea, den Anlagen A, B und C. Lediglich die Anlage KA zeichnet sich im Vergleich zu den anderen Anlagen durch eine deutlich unterschiedliche und diversere bakterielle Gemeinschaft aus.

3.3.2 Bakterielle Biozönose bei Prozessstörungen

Neben der archaeellen Artenzusammensetzung sollte auch die bakterielle Dynamik im Verlauf von Prozessstörungen untersucht werden. Dazu wurden die Proben des ersten Ammonium-Toxizitäts-Versuches sowie des zweiten Versauerungsversuches mittels 454-Amplikonsequenzierung analysiert.

Tabelle 47: Durch Bacteria-spezifische 454-Amplikonsequenzierung erfasste Anzahl der Sequenzen und OTUs sowie Diversitätsindices der verschiedenen Hemmproben.

		Anzahl Sequenz en	Abdeckung („coverage“) [%]	Anzahl OTUs	inverser Simpson- Index	Chao1 (Konfidenz- Intervall)	ACE (Konfidenz- Intervall)
Ammonium-Intoxikation I	Kontrolle	8919	97,2	517	16,0	981 (842-1179)	1166 (1063-1288)
	leichte Hemmung	6886	96,5	487	28,0	903 (778-1080)	1219 (1105-1354)
	Schwere Hemmung	7331	96,0	493	21,2	1221 (1009-1520)	2151 (1944-2388)
	„Erholung“	8770	96,8	547	19,5	1064 (916-1270)	1435 (1306-1586)
Versauerung II	Kontrolle I	10819	98,0	487	9,8	811 (712-953)	1070 (972-1188)
	Versauerung	4178	95,3	329	3,1	758 (614-975)	1287 (1137-1466)
	Kontrolle II	11038	98,0	464	11,0	867 (742-1047)	1206 (1090-1344)
	Erholung	10536	97,9	439	11,6	910 (761-1129)	1270 (1142-1421)

Die Anzahl der dabei erhaltenen Sequenzen und OTUs sind der Tabelle 47 zu entnehmen. Durch die Analyse konnte die Diversität in den Proben nicht vollständig abgedeckt werden, was an den nur leicht abflachenden *rarefaction*-Kurven zu erkennen ist (Abbildung 45). Die Abdeckung lag in den Proben zwischen 95 und 98 %. Außerdem wurde durch den Chao1- und ACE-Index eine etwa zwei- bis dreimal höhere Anzahl an OTUs vorausberechnet, als tatsächlich erfasst werden konnten. Erwartungsgemäß war die Zahl der OTUs, sowie der Chao1- und ACE-Index mit denen aus Anlage A vergleichbar. Der inverse Simpson-Index war in den Proben der schweren Hemmung und „Erholung“ (Ammonium-Intoxikation I) vergleichbar und etwas höher als in der Kontrolle. In der leichten Hemmung wurde der größte inverse Simpson-Index berechnet. In den Proben des Versauerungsversuches waren die Diversitätsindices vergleichbar, was auf ein ähnliches Maß an Diversität in den Proben hinweist. Lediglich der inverse Simpson-Index in der Versauerungsprobe war deutlich geringer als in den anderen Proben, was vermutlich auf die deutliche geringere Sequenzanzahl in der Probe zurückzuführen ist.

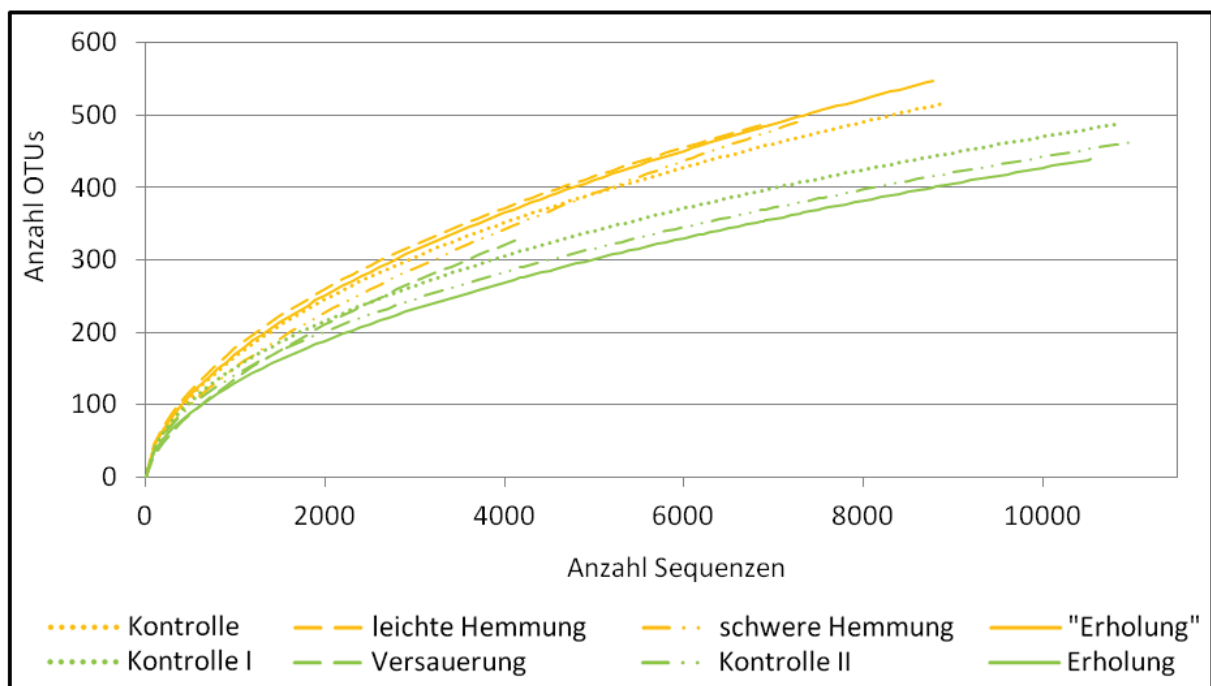


Abbildung 45: Aus der Bacteria-spezifischen 454-Amplikonsequenzierung resultierende *rarefaction*-Kurven der einzelnen Hemmproben.

Die *rarefaction*-Kurven wurden aus der Anzahl der OTUs mit einer Sequenz-Dissimilarität von $\leq 3\%$ pro Anzahl der Sequenzen berechnet.

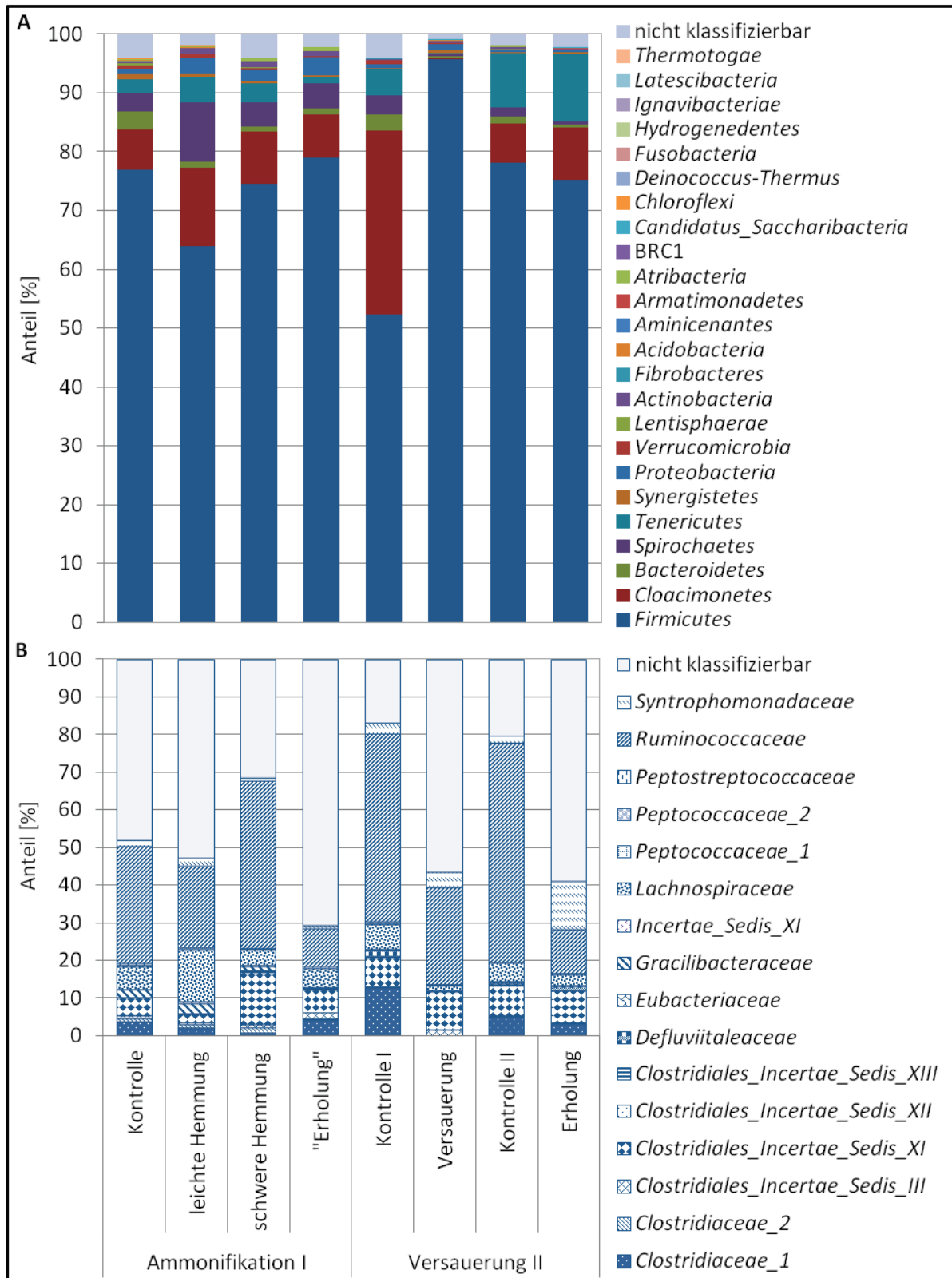


Abbildung 46: Durch Bacteria-spezifische 16S-Amplikon-sequenzierung bestimmte relative Abundanzen der einzelnen Taxa im Verlauf von Prozessstörungen.

Dargestellt sind die Anteile der mittels RDP-Taxonomie klassifizierten Sequenzen der Anlagen an der Gesamt-Anzahl der Sequenzen auf Phylum-Ebene (A) bzw. die Anteile der einzelnen Familien an der Gesamt-Zahl aller *Clostridiales* (B). Die genaue Zusammensetzung sind dem Anhang zu entnehmen (Tabelle A22, Tabelle A23).

Die Diversität der Proben aus dem Versuch zur Ammonium-Intoxikation ist auf Phylum-Ebene vergleichbar mit der in Anlage A. Dominierend waren Organismen der Gruppen *Firmicutes* ($\approx 63\text{-}79\%$ aller Sequenzen) und *Cloacimonetes* ($\approx 7\text{-}13\%$) (Abbildung 46 A). Auf dieser taxonomischen Ebene konnten im Verlauf der Ammonium-Intoxikation keine Veränderungen in der Biozönose detektiert werden. Lediglich in der leichten Hemmung konnte ein leichter Anstieg der *Spirochaetes* ($\approx 10\%$ im Vergleich zu $\approx 3\text{-}4\%$ in den anderen Proben) nachgewiesen werden. In allen Proben der Ammonium-Intoxikation konnten $\approx 60\text{-}75\%$ der *Firmicutes* auf Ordnungs-Ebene nicht klassifiziert werden. Die Mehrzahl der verbleibenden Sequenzen gehörte zur Ordnung der *Clostridiales* ($\approx 22\text{-}32\%$). Ca. 31% davon konnten als *Ruminococcaceae*, $\approx 6\%$ als *Lachnospiraceae*, $\approx 5\%$ als *Clostridiales_Incertae_Sedis_XI* und $\approx 3\%$ als *Clostridiaceae_1* identifiziert werden. Etwa 48% der *Clostridiales* waren nicht näher klassifizierbar. Diese Zusammensetzung der *Clostridiales* ist mit der in Anlage A in etwa vergleichbar.

Während der leichten Hemmung ging die Zahl der *Ruminococcaceae* auf $\approx 22\%$ zurück, die Zahl der *Lachnospiraceae* hingegen stieg auf ca. 14% . In der schweren Hemmung stieg der Anteil der *Ruminococcaceae* auf $\approx 44\%$ und der der *Clostridiales_Incertae_Sedis_XI* auf $\approx 14\%$ an. Im Gegensatz dazu sank die Zahl der *Lachnospiraceae* auf ca. 5% und der *Clostridiaceae_1* auf unter 1% . In der „Erholung“ konnte ein Großteil der Sequenzen (ca. 71%) nicht klassifiziert werden. Der Anteil der *Ruminococcaceae* sank hier auf $\approx 10\%$. Die relativen Abundanzen der übrigen Familien waren mit denen aus der Kontrolle vergleichbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die bakterielle Zusammensetzung, im Vergleich zur archaeellen Biozönose, im Verlauf der Ammonium-Intoxikation deutlich weniger verändert.

Während des Versauerungsversuches konnten schon auf Phylum-Ebene Unterschiede detektiert werden. So war in der Kontrolle I der Anteil der *Firmicutes* mit nur $\approx 52\%$ aller Sequenzen am geringsten. Im Verlauf des Experiments stieg deren Anteil jedoch auf $\approx 78\%$ in der Kontrolle II. Dementsprechend war in der Kontrolle I der Anteil der *Cloacimonetes* mit $\approx 31\%$ am höchsten und sank auf $\approx 7\%$ in der Kontrolle II. In der Versauerungsprobe hingegen konnten fast ausschließlich ($\approx 96\%$) Sequenzen des Phylums der *Firmicutes* nachgewiesen werden. Auf Phylum-Ebene war die bakterielle Zusammensetzung der Erholung mit der in der Kontrolle II vergleichbar. Wie auch in den anderen untersuchten Proben wurden die *Clostridiales* als die dominante Ordnung innerhalb der *Firmicutes* identifiziert. In der Versauerungsprobe war deren Anteil mit $\approx 87\%$ besonders hoch. In dieser Probe konnten lediglich $\approx 11\%$ der *Firmicutes* nicht näher klassifiziert werden. In den übrigen Proben lag der Anteil der *Clostridiales* bei $\approx 46\text{-}62\%$ und der der nicht klassifizierbaren Sequenzen bei $\approx 33\text{-}51\%$. Bei Betrachtung der einzelnen Familien innerhalb der *Clostridiales* konnte eine ähnliche Zusammensetzung in den beiden Kontrollen detektiert werden (≈ 50 bzw. 58% *Ruminococcaceae*, je $\approx 8\%$ *Clostridiales_Incertae_Sedis_XI*, 12 bzw. 5% *Clostridiaceae_1* und 7 bzw. 5% *Lachnospiraceae*).

Im Gegensatz dazu war in den Proben der Versauerung und Erholung der Anteil nicht klassifizierbarer Sequenzen mit $\approx 57\%$ bzw. $\approx 59\%$ deutlich höher als in den Kontrollen. Außerdem lag die relative Abundanz der *Ruminococcaceae* in der Versauerungsprobe bei lediglich $\approx 26\%$ und in der Erholung sogar nur bei $\approx 12\%$. In der Erholung konnte zudem mit $\approx 13\%$ der höchste Anteil der *Syntrophomonadaceae* nachgewiesen werden. In den übrigen Proben lag deren Anteil bei unter 5% . Weitere Unterschiede konnten in der relativen Abundanz der *Clostridiaceae_1* gezeigt werden, die insbesondere in der Versauerung mit nur $\approx 0,1\%$ sehr gering war. Auch der Anteil der *Lachnospiraceae* war mit $\approx 1\%$ bzw. $\approx 3\%$ in der Versauerung und Erholung etwas geringer als in den Kontrollen. Die relativen Abundanzen der *Clostridiales_Incertae_Sedis_XI* waren mit denen in den Kontrollen vergleichbar ($\approx 10\%$ bzw. $\approx 9\%$). Wie bereits die archaeelle Zusammensetzung unterschied sich also auch die bakterielle Biozönose der Erholung von der der Versauerung.

4 DISKUSSION

4.1 Evaluierung molekularer Methoden zur Untersuchung von Mikroorganismen in Biogasanlagen

Aufgrund der sehr eingeschränkten Kultivierbarkeit von Mikroorganismen aus der Umwelt haben Kultur-unabhängige Methoden in der mikrobiellen Ökologie zunehmend an Bedeutung gewonnen. Diese ermöglichen auch die Detektion bisher unbekannter Organismen, die bisher noch nicht kultiviert wurden und vervollständigen damit das Bild einer mikrobiellen Biozönose aus einem untersuchten Habitat. Aus diesem Grund wurden auch im Rahmen dieser Arbeit die in Biogasanlagen vorkommenden Mikroorganismen, insbesondere Archaeen, ohne den Zwischenschritt der Kultivierung untersucht. Dabei wurden sowohl DNA-basierte Methoden als auch mikroskopische *in situ* Analysen verwendet und zunächst auf deren Eignung für die Untersuchung von Biozönosen in Biogasanlagen evaluiert.

Grundlegend für eine exakte Darstellung der mikrobiellen Gemeinschaft ist vor allem eine geeignete Methode zur DNA-Extraktion. Für verschiedene Habitate stehen bereits optimierte Kit-Systeme zur DNA-Isolation zur Verfügung. Ein spezifisches Verfahren zur Extraktion von DNA aus Biogasanlagen wurde jedoch bisher noch nicht entwickelt. Daher wurden zu Beginn der Untersuchungen verschiedene Kit-Systeme bezüglich ihres Einflusses auf nachfolgende Analysen, wie DGGE und qPCR, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Wahl des Kit-Systems einen erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse von qualitativen und quantitativen Diversitätsuntersuchungen hat. Bereits die Qualität der isolierten DNA bei Verwendung verschiedener Kit-Systeme war sehr unterschiedlich. Lediglich die Extraktion mit MN und Qia resultierte in qualitativ hochwertiger DNA. Mittels elektrophoretischer Auftrennung konnten außerdem die höchsten DNA-Konzentrationen nach Isolation mit MN erreicht werden. Da bei der spektrophotometrischen Bestimmung der DNA-Konzentration zum Teil mit anderen Kits höhere Konzentrationen gemessen wurden, kann hier von Kontaminationen ausgegangen werden. Wahrscheinlich handelt es sich dabei insbesondere um Huminsäuren, die häufig beim Abbau organischen Materials entstehen und zusammen mit der DNA eluiert werden. Da Huminsäuren ein ähnliches Absorptionsmaximum [ca. 265 nm, (178)] wie DNA besitzen, können diese jedoch photometrisch nicht von der DNA abgegrenzt werden, sodass die DNA-Konzentration in der spektrophotometrischen Messung im Vergleich zur gelelektrophoretischen Bestimmung überschätzt wird. Huminsäuren sind als potente PCR-Inhibitoren bekannt (179) und können demnach einen signifikanten Einfluss auf sich anschließende PCR-Untersuchungen haben (180). Das Vorhandensein solcher Huminsäuren könnte eine Erklärung für die

unzuverlässige PCR-Amplifikation der UC-DNA sein. Ähnliche Probleme bei der Untersuchung von Bodenproben mit Hilfe dieses Kits wurden bereits dargestellt (181). Ebenso konnte bereits gezeigt werden, dass bei Verwendung von UC zur DNA-Isolation aus Bodenproben lediglich 35 % der inhibitorischen Substanzen entfernt werden konnten (182).

Bei der Verwendung von PS zur DNA-Isolation wurden in Abhängigkeit vom Probenursprung sehr unterschiedliche Resultate erzielt. So waren die Ergebnisse der qPCR und Archaea-DGGE für beide KA-Proben in Übereinstimmung mit denen der anderen Kit-Systeme, während bei der Untersuchung der Proben aus Anlage A die Ergebnisse der qPCR und *Methanobacteriales*-DGGE deutlich verschieden von denen der übrigen Kit-Systeme waren. Demnach scheinen einige Organismen in der mit dem PS-Kit isolierten DNA nicht ausreichend vertreten zu sein. Dies kann möglicherweise auf eine unvollständige Lyse der Zellen während der DNA-Isolation zurückgeführt werden. Insbesondere die sehr widerstandsfähige Zellwandstruktur Gram-positiver Bakterien kann die DNA-Isolation erschweren, was zur Unterrepräsentation dieser Organismen führt (183). In Biogasanlagen ist dieser Aspekt von besonderer Bedeutung, da die Gram-positiven *Clostridia* häufig in großer Zahl zu finden sind (siehe 1.1.1). Zudem ist es wahrscheinlich, dass auch Archaea durch ihre sehr diversen Zellabschlussstrukturen (siehe 1.3) mit unterschiedlicher Effektivität aufgeschlossen werden. Auch das unvollständige Ablösen der Zellen vom Pflanzenmaterial (wie beispielsweise der als Substrat eingesetzten Maissilage) kann die Isolation von DNA beeinträchtigen. Um diesen Phänomenen entgegen zu wirken wurden eine Vielzahl von Aufschlussmethoden, wie der enzymatische Aufschluss mittels Proteinase K oder Lysozym, Erhitzen, Einfrieren und Auftauen, die Verwendung von SDS, Ultraschall-Behandlung und der mechanische Aufschluss mit Glasperlen („*bead-beating*“) (184) (185) (186) (187) (188), in der Literatur beschrieben. Jedoch sollte von zu harschen Techniken, wie sie zum Teil für den Aufschluss Gram-positiver Zellen benötigt werden, abgesehen werden, da diese zum Scheren der DNA bereits aufgeschlossener Gram-negativer Organismen führen können (183). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zusätzlich zur Zelllyse, wie sie im Protokoll der Kit-Systeme vorgesehen ist, weitere Behandlungen (wie Erhitzen, Ultraschall- und Lysozym-Behandlung) getestet (Daten nicht gezeigt). Dadurch konnte jedoch die Zahl der detektierten Zellen nicht erhöht werden, sodass diese Methoden nicht weiter berücksichtigt wurden.

Bei der DNA-Isolation mit MN und Qia ist, anders als bei den übrigen getesteten Kit-Systemen, ein zusätzlicher Schritt zur Entfernung von inhibitorischen Substanzen vorgesehen. Dadurch lässt sich die höhere Reinheit der mit diesen Kits isolierten DNA erklären, die anhand der 260/280-Verhältnisses bestimmt wurde. In Übereinstimmung mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit konnte bereits eine erfolgreiche Eliminierung inhibitorischer Substanzen aus verschiedenen Umweltproben (bis zu 96 %) bei Verwendung des Qia-Kits nachweisen werden (182). Nichtsdestotrotz wurden nach DNA-Isolation mit Qia sowohl in der DGGE- als auch qPCR-Analyse

einige Ausreißer detektiert, was insbesondere an den hohen Standardabweichungen der qPCR-Resultate deutlich wird. Insgesamt wurde die größte Diversität und die höchsten Zellzahlen nach DNA-Isolation mit MN detektiert. Zudem waren die DGGE- und qPCR-Resultate am besten reproduzierbar. Ein ähnliches Ergebnis wurde bereits bei der Untersuchung von Reiskulturböden erzielt (189).

Zusammenfassend konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse ein nennenswerter Einfluss der verschiedenen Kit-Systeme zur DNA-Isolation auf die nachfolgenden Analysen zur mikrobiellen Diversität und Abundanz in Proben aus Biogasanlagen, die unter verschiedenen Bedingungen (wie unterschiedlichen Substraten) betrieben werden, nachgewiesen werden. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde die archaeelle Diversität am besten durch das MN-Kit abgedeckt, weshalb dieses auch für die folgenden Analysen verwendet wurde. Des Weiteren waren hier die Ergebnisse am besten reproduzierbar und dieses Kit war auch für Proben verschiedenen Ursprungs gut geeignet. Es muss jedoch für quantitative Analysen beachtet werden, dass es zu Sättigungseffekten bei der DNA-Isolation kommen kann und die Menge des eingesetzten Materials optimiert werden muss, um Verluste bei der DNA-Isolation zu vermeiden.

Ebenso wie die DNA-Isolation selbst beeinflussen auch die nachfolgenden Analysen das Untersuchungsergebnis. Es ist bekannt, dass insbesondere die Wahl der *Primer*-Paare auf PCR-basierte Analysen einen fundamentalen Einfluss hat (190). Aus diesem Grund wurde zur Optimierung der Archaea-DGGE eine Reihe von *Primer*-Paaren evaluiert. Es zeigte sich, dass nur wenige *Primer*-Kombinationen geeignet waren, um die Diversität in den Proben darzustellen. Bei diesen war jedoch eine einzelne 16S rDNA-Sequenz durch mehrere DGGE-Signale charakterisiert. Dieses Phänomen ist bereits bekannt und kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen können heterogene 16S-Kopien in einem Organismus auftreten, was zu Mehrfachsignalen in der DGGE führt (191) (192). Dieses Phänomen kann jedoch bei klonierten Einzelsequenzen ausgeschlossen werden. Zum anderen kann es zur Bildung von Heteroduplexen zwischen mehreren Sequenzen kommen (173). Des Weiteren können PCR-Artefakte in Doppelsignalen im DGGE-Gel resultieren (173). Diese entstehen beispielsweise durch unvollständige Adenylierung des Amplifikates während der PCR (193). Außerdem führen stark ausgeprägte Sekundärstrukturen bzw. das Vorkommen eines Amplikons in verschiedenen Konformationen aufgrund des unterschiedlichen Schmelzverhaltens dieser Strukturen ebenso zur Bildung von Mehrfachsignalen (173). Es ist wahrscheinlich, dass die im Rahmen dieser Arbeit mittels Archaea-DGGE detektierten Mehrfachsignale auf dieses Phänomen zurückzuführen sind, da die untersuchten DGGE-Fragmente durch eine große Zahl von Sekundärstrukturen charakterisiert waren und auch bei verschiedenen Klonen gleiche Signalkombinationen in verschiedenen Bereichen des Gels zu detektieren waren. Bestätigt wird diese Theorie durch die Tatsache, dass die durch Reamplifikation gewonnenen Sequenzen der entsprechenden Signale

identisch waren (Daten nicht gezeigt). Zudem lagen die Schmelztemperaturen der theoretisch wahrscheinlichen Sekundärstrukturen der Archaea-DGGE-Fragmente bei 66-71 °C, sodass ein Aufschmelzen nicht allein durch die Lauftemperatur der DGGE von 60 °C möglich ist. Im Gegensatz dazu lagen die Schmelztemperaturen der Sekundärstrukturen der *Methanobacteriales*-DGGE-Fragmente aus Anlage A im Bereich von 62-63 °C (Daten nicht gezeigt). Diese können also möglicherweise schon sehr früh im DGGE-Gel denaturieren, sodass bei dieser DGGE in der Regel Einzelsignale je Sequenz zu detektieren waren. Des Weiteren konnten überlagerte DGGE-Signale detektiert werden, wobei ein einzelnes Signal mehrere verschiedene Organismen repräsentiert. Ähnliche Resultate konnten bereits bei der Untersuchung von Sulfat-Reduzierern in der Bergwerkentwässerung (193), Ammonium-oxidierenden Bakterien in Küstensanddünen (194) sowie von bakteriellen Biozönosen in Gewässern (195) und Käse (196) erzielt werden. Demnach kann von der Signalanzahl in der DGGE nicht direkt auf die α -Diversität (d. h. die Anzahl der in einem Habitat vorkommenden Arten) in den Proben geschlossen werden. In Kombination mit der Sequenzierung einzelner Signale bzw. der Klonierung von Proben können jedoch mit Hilfe der DGGE effizient Schlüsselorganismen identifiziert und deren Dynamik innerhalb der Biozönose beobachtet werden. Dabei ist zu beachten, dass bei Verwendung von *Primer*-Kombinationen für größere Organismengruppen aufgrund der begrenzten Auflösung im Gel nur ein kleiner Teil der mikrobiellen Gemeinschaft (in der Regel die abundantesten Vertreter) abgebildet werden kann (102) (197) und zur höheren Auflösung Gruppen-spezifische *Primer* verwendet werden müssen (177).

Um die Ergebnisse der PCR-basierten Analytik zu validieren, eignen sich mikroskopische *in situ* Methoden, da diese nicht dem Einfluss der DNA-Isolation unterliegen. So konnten durch den Vergleich mit der mikroskopisch gezählten Gesamtzellzahl die Resultate der qPCR (Summe aus den Zellzahlen von Bacteria und Archaea) bestätigt und damit ein nennenswerter Verlust bei der DNA-Isolation ausgeschlossen werden. Um die relative Abundanz einzelner Organismengruppen zu bestimmen, sollte außerdem die CARD-FISH zum Einsatz kommen. Kritischer Schritt dabei ist, dass die HRP-gekoppelte Oligonukleotidsonde zu ihrem Zielmolekül (16S rRNA) in die Zellen gelangen muss. Dies kann zum einen durch eine sehr ausgeprägte extrazelluläre Matrix und zum anderen durch unzureichend permeabilisierte Zellen verhindert werden. Bei einer sehr heterogenen mikrobiellen Zusammensetzung von Proben ist jedoch insbesondere die Permeabilisierung der Gesamtheit aller Zellen schwierig (110). Für eine erfolgreiche Permeabilisierung ist bereits die Fixierung von entscheidender Bedeutung. Häufig wird dabei die Fixierung mittels Paraformaldehyd angewendet (198) (199) (200) (201). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass für Gram-positive Bakterien eine Fixierung mit Ethanol günstiger ist (111). Ebenso sind einzelne Permeabilisierungsschritte für unterschiedliche Mikroorganismen nicht gleichermaßen geeignet. So ist beispielsweise eine Inkubation mit Achromopeptidase für *Actinobacteria* und möglicherweise

auch andere Gram-positive Bakterien essentiell (116), während diese für Methanogene (insbesondere solche mit S-Layern) ungeeignet ist und sogar zu deren Verlust führen kann (113). Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher zur Optimierung der CARD-FISH eine Reihe von Fixierungs- und Permeabilisierungstechniken getestet und verglichen. Im Gegensatz zur bisher veröffentlichten Literatur war es dennoch nicht möglich, die mikrobiellen Zellen im Biogasschlamm reproduzierbar zu hybridisieren. Auch eine Verringerung der Formaldehydkonzentration, die durch Verringerung der Quervernetzung die Hybridisierung verbessern kann (110), blieb erfolglos. Es ist demnach wahrscheinlich, dass nicht die unzureichende Permeabilisierung der Zellen ursächlich für die schlechte Hybridisierbarkeit in den Proben ist. Vielmehr scheint es durch die stark ausgeprägte extrazelluläre Matrix im Probenmaterial zu einem vorzeitigen Abbinden der Oligonukleotid-Sonde zu kommen. Dafür spricht auch das stark ausgeprägte Hintergrundsignal, das in allen Proben detektiert wurde. Um diese extrazellulären Strukturen abzubauen, wurden im Rahmen dieser Arbeit enzymatische Behandlungen noch vor der Fixierung getestet. Da eine Inkubation mit Proteinase K als Permeabilisierungszugabe für die CARD-FISH bei der Untersuchung verschiedener Ökosysteme bereits erfolgreich Anwendung fand (119) (202) (203) (204), wurde zunächst der Abbau des extrazellulären Materials mit diesem Enzym untersucht. Durch diese enzymatische Vorbehandlung war es zwar möglich, Bacteria zu hybridisieren, jedoch war deren relativer Anteil an der Gesamtzellzahl mit 50 % sehr gering. Aufgrund des hohen Maissilage-Anteils im Substrat wurde im Anschluss eine Inkubation mit β -Amylase getestet, die zum Abbau der Polysaccharide führen sollte. Es konnte bereits gezeigt werden, dass β -Amylase zum Abbau extrazellulären Materials geeignet ist (162). In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte dadurch die Hybridisierbarkeit weiter verbessert werden. Aufgrund der sehr komplexen Zusammensetzung aus verschiedenen Polymeren schien es jedoch sinnvoll, ein Enzymgemisch zum Abbau dieser Strukturen zu nutzen. Ausgewählt wurde dafür das Präparat Pectinex, ein aus der Nahrungsmittelindustrie bekanntes Enzymgemisch aus Pectinasen, Cellulasen und Hemicellulasen, das häufig für die Eliminierung von Biofilmen verwendet wird. Es ist bekannt, dass dieses Enzympräparat durch Abbau der extrazellulären Matrix und nicht durch eine bakteriozide oder bakteriostatische Wirkung Biofilme angreift (174) (205). Aus diesem Grund schien es für die Anwendung im Rahmen der CARD-FISH als geeignet. Tatsächlich konnte nach Vorbehandlung mit Pectinex in geringen Konzentrationen die Hybridisierbarkeit deutlich verbessert werden. Allerdings wurde nach der Enzymbehandlung lediglich der Überstand zur weiteren Analyse verwendet. Es ist demnach wahrscheinlich, dass Zellen, die am Pflanzenmaterial der Probe anhaften und sich durch die Vorbehandlung nicht ablösen, durch die Analyse nicht abgedeckt werden. Um auch diese Zellen zu analysieren, wurde zusätzlich eine Vorbehandlung mit Tween 80 durchgeführt, die bereits erfolgreich in Proben aus anderen Biogasreaktoren zum Einsatz kam (175) (176). Durch die Verwendung dieses Detergenz werden Komponenten der extrazellulären Matrix solubilisiert, was zur verbesserten

Hybridisierbarkeit in den Proben führt. Nach der Tween 80 Vorbehandlung wurde, im Gegensatz zur Pectinex Behandlung, das Zentrifugat zur Hybridisierung genutzt, sodass auch an Partikeln haftende Zellen untersucht werden konnten. Im Vergleich beider Vorbehandlungen konnten jedoch keine Unterschiede detektiert werden. Es scheint demnach keinen selektiven Einfluss der verschiedenen Vorbehandlungen auf die untersuchten Organismengruppen zu geben. Trotz dieser Vorbehandlungen waren einige Proben immer noch von einer sehr schlechten Hybridisierbarkeit geprägt und häufig erschwerte ein starker Hintergrund die Auswertung. Möglicherweise wurde die Hybridisierung durch das Vorhandensein von Störstoffen, wie Huminsäuren, Metallen oder anderen organischen und anorganischen Substanzen, inhibiert, wie es auch bei der Untersuchung von Biogasanlagen, in denen kommunaler Abwasserschläm fermentiert wird, beobachtet werden konnte (206). Eine weitere Möglichkeit für die geringen Signalstärken könnte auch eine zu geringe Aktivität der Zellen sein. Insbesondere die Kapazität des hydrogenotrophen Stoffwechsels in den Anlagen A, B und C wird nicht vollständig genutzt und kann durch Zugabe von Wasserstoff deutlich gesteigert werden (207). Dies lässt den Schluss zu, dass auch die Anzahl der Ribosomen möglicherweise zu gering ist, um klare Sondensignale detektieren zu können. Wie bereits für Proben aus Kühlwassersystemen gezeigt (208), kann eine Zugabe von Substrat zu den Proben vor der Fixierung durch Erhöhung des Zellvolumens und des Ribosomenanteils zur Verbesserung des Sondensignals führen. Ein Begasen der Proben mit Wasserstoff vor der Fixierung hat jedoch die Signalintensitäten im Rahmen dieser Arbeit nicht verbessert.

4.2 Archaeelle Biozönose in Biogasanlagen in Abhängigkeit vom eingesetzten Substrat

Obwohl die Biogasproduktion in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen hat, sind die genaue Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft sowie deren Bedürfnisse häufig noch unverstanden. Insbesondere das Vorkommen einzelner archaeeller Gruppen unterliegt derzeit intensiver Diskussion und es ist nicht möglich, anhand verschiedener Prozessparameter auf die archaeelle Population rückzuschließen. Daher war es ein Hauptziel dieser Arbeit, weitere Einblicke in die archaeelle Diversität von Biogasanlagen in Abhängigkeit vom eingesetzten Substrat zu gewinnen. Dazu wurden vier Anlagen untersucht, die mit Maissilage als Hauptsubstrat und verschiedenen Co-Substraten (A, B, C und KA) sowie eine Anlage, die mit kommunalem Abwasserschläm als Substrat (KL) betrieben werden. In den Anlagen A, B und C waren vor allem zwei methanogene Genera vorherrschend: *Methanoculleus* und *Methanosarcina*. In anderen Studien, in denen mit Maissilage betriebene Anlagen untersucht wurden, konnte ebenfalls *Methanoculleus* als der dominante Vertreter der Archaea nachgewiesen werden (209) (210). In diesen Studien spielte jedoch, im

Gegensatz zu den hier erzielten Ergebnissen aus Anlage A und C, *Methanosarcina* keine Rolle. Allerdings konnten in anderen Biogasanlagen durchaus *Methanosarcina* gefunden werden (211) (212) (213). Das Vorkommen dieses Genus scheint daher in Biogasanlagen bisher schlecht vorhersehbar zu sein. Zu diesem Ergebnis kamen auch Lv *et al.*, die in nur zwei von vier parallel mit Maissilage betriebenen Reaktoren *Methanosarcinen* vorfanden (214). Eine Ursache für die Unterschiede in den Verhältnissen von *Methanoculleus* und *Methanosarcina* in den verschiedenen Anlagen ist möglicherweise die Variation des Co-Substrates. Dies konnte zum Beispiel im Langzeitverhalten der archaeellen Biozönose in Anlage A gezeigt werden. So bestimmte jeweils der Anteil an Rindermist (RM) bzw. Hühnertrockenkot (HTK) die Abundanz beider Genera. Zwischen März bis November 2013 sowie September 2014 bis April 2015 wurden in etwa gleich viel RM und HTK bzw. mehr RM gefüttert, während zwischen Januar und August 2014 der Anteil des HTK deutlich größer war. Gleichzeitig mit dieser Umstellung in der Fütterung ging auch der Anteil der *Methanosarcinen* in den Proben zwischen Januar und August 2014 zurück. Es scheint also, dass ein erhöhter Anteil an RM das Vorkommen von *Methanosarcina* begünstigt. Da sich die methanogenen Populationen im Verdauungstrakt verschiedener Tiere deutlich unterscheiden können (215) (216), ist möglicherweise das Einbringen verschiedener Inokula mit dem Substrat ursächlich für diese Beobachtung. Außerdem kann eine unterschiedliche Zusammensetzung an Nährstoffen bzw. deren Bioverfügbarkeit in den verschiedenen Co-Substraten zusätzlich selektiv einzelne Mikroorganismen beeinflussen. Auch in Anlage C wurden zwischen 22 und 36 % Rindergülle gefüttert, was möglicherweise die Dominanz von *Methanosarcina* begründet. In Übereinstimmung mit den hier erzielten Resultaten konnten auch De Francisci *et al.* deutliche Veränderungen der mikrobiellen Biozönose nach Fütterungsumstellung beobachten (217). In Anlage B begünstigte möglicherweise die Zusammensetzung der übrigen Co-Substrate (Grünroggen-GPS, Pferdemist, HTK und Schweinegülle) den Genus *Methanoculleus*, da in dieser Anlage trotz der Fütterung von 10- 24 % Rindergülle kaum *Methanosarcina* nachgewiesen wurde. Außerdem ist es wahrscheinlich, dass das Substrat nicht allein ausschlaggebend für die mikrobielle Zusammensetzung in den untersuchten Biogasreaktoren ist. So konnte beispielsweise eine negative Korrelation zwischen der Abundanz von *Methanoculleus* und dem $\text{NH}_4\text{-N}$ -Gehalt in Anlage A gezeigt werden. Insbesondere während der beiden Störfälle im Oktober/November 2013 und im April 2014 war die Abundanz von *Methanoculleus* geringer, während die $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration erhöht war (die genauen Einflüsse der beiden Störfälle auf die mikrobielle Gemeinschaft in der Anlage werden im Kapitel 4.4 näher diskutiert). Diese Korrelation suggeriert, dass im Allgemeinen bei sinkendem $\text{NH}_4\text{-N}$ -Gehalt die Abundanz von *Methanoculleus* steigt. In Anlage B ist jedoch, trotz vergleichsweise hoher $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration, *Methanoculleus* dominierend, während in Anlage C, trotz der geringen Konzentration des $\text{NH}_4\text{-N}$, *Methanosarcina* der abundanteste archaeelle Genus ist und *Methanoculleus* nur in geringem Maß vorhanden. In diesen

Anlagen könnten noch weitere Faktoren eine entscheidende Rolle zu spielen. Beispielsweise wird der Einfluss der Raumbelastung auf die archaeelle Biozönose in Biogasreaktoren derzeit diskutiert. So konnte bei steigender Raumbelastung (über 3 g/l/d) ein Anstieg der Abundanz hydrogenotropher Archaea gezeigt werden (218) (219). Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen Studie eine steigende Abundanz von *Methanosarcinen* bei steigender Raumbelastung (über 3,4 g/l/d) nachgewiesen. Diese Beobachtung wurde darauf zurückgeführt, dass *Methanosarcina* im Allgemeinen sehr tolerant gegenüber Stressbedingungen ist (220). Die Resultate der vorliegenden Arbeit weisen ebenfalls darauf hin, dass *Methanosarcina* durch eine hohe Raumbelastung begünstigt wird, da die Anlage C mit der höchsten Raumbelastung der hier untersuchten Anlagen betrieben wird. Die geringere Raumbelastung in Anlage B begünstigte dort möglicherweise *Methanoculleus*. Dennoch ist es wahrscheinlich, dass auch weitere Prozessgrößen Einfluss auf die mikrobielle Biozönose in den untersuchten Anlagen nehmen. Aufgrund dieser Vielschichtigkeit verschiedener Einflussfaktoren auf den Biogasprozess ist ein Rückschluss auf die mikrobielle Zusammensetzung anhand nur eines Prozessparameters nicht möglich.

Neben den Anlagen A, B, C wurde auch noch eine vierte Anlage (KL) untersucht, in der Maissilage als Substrat verwendet wird. Diese war jedoch von einer anderen archaeellen Zusammensetzung geprägt. So konnten in DGGE und Klonierung insbesondere Organismen des Genus *Methanothrix* nachgewiesen werden, während nur ein geringer Teil der Archaeen dem Genus *Methanoculleus* angehörte. Auch *Methanothrix* wurde bereits in verschiedenen Studien in Biogasanlagen gefunden (93) (221) (222) und ist, wie *Methanosarcina*, zur acetiklastischen Methanogenese befähigt. Es ist bekannt, dass das Vorkommen der beiden Organismengruppen in Biogasanlagen vor allem durch die Acetatkonzentration, aber auch Ammonium- FOS-Konzentration bestimmt wird (223). Dabei kommt *Methanothrix* bei niedrigen und *Methanosarcina* bei hohen Acetatkonzentrationen vor (224) (225). Demnach ist es nicht überraschend, dass in der Anlage KL, in der die Acetatkonzentration etwa zehnfach geringer ist als in Anlage A, vor allem *Methanothrix* zu finden ist. Die Ursache dafür liegt im ersten Schritt der acetiklastischen Methanogenese, bei dem Acetat zu Acetyl-CoA aktiviert wird. Für diesen Schritt nutzen *Methanosarcina* sp. die Acetatkinase-Phosphotransactylase, die nur eine geringe Affinität zu Acetat besitzt, während *Methanothrix* sp. die hoch affine Adenosinmonophosphat-bildene Acetyl-CoA-Synthetase verwenden (226). Daraus ergibt sich, dass für *Methanothrix* geringe Acetatkonzentrationen von 7-70 μ M ausreichend für das Wachstum sind, während Organismen der Familie *Methanosarcina* höhere Konzentrationen von 0,2-1,2 mM Acetat für ihr Wachstum benötigen (227). Die geringere Acetatkonzentration in Anlage KL ist möglicherweise auch ursächlich für den relativ geringen Anteil an *Methanoculleus* in dieser Anlage, da bekannt ist, dass *Methanoculleus bourgensis* MS2^T Acetat für sein Wachstum (jedoch nicht für seinen Energiestoffwechsel) benötigt (228) (229). Mit Hilfe der 454-Amplikonsequenzierung konnte

allerdings gezeigt werden, dass *Methanothrix* und *Methanoculleus* nur ca. 11 bzw. 6 % der archaeellen Population ausmachen. Das erklärt auch, warum in der CARD-FISH nur sehr vereinzelt *Methanothrix*-spezifische Signale detektiert werden konnten. Zusätzlich wurde ein großer Anteil (ca. 27 %) *Methanobacterium* detektiert. Auch in anderen Anlagen wurde bereits *Methanobacterium* gefunden (93) (230) (231) und einige bisher kultivierte Vertreter dieses Genus wurden erstmals aus Biogasreaktoren isoliert (232) (233) (234) (235). Diese Biogasanlagen nutzten jedoch meist andere Substrate, als die hier untersuchte Anlage KL. Innerhalb des anaeroben Stoffwechsels im Biogasreaktor kommt diesen hydrogenotrophen Methanogenen möglicherweise eine wichtige Rolle im Rahmen des syntrophen Abbaus verschiedener Fettsäuren zu. So ist beispielsweise bekannt, dass *Methanobacterium thermoautotrophicus* Stamm ΔH im Zusammenspiel mit syntrophen Bakterien sowohl in Kultur als auch in Biogasreaktoren in der Lage ist, Fettsäuren (wie Butyrat und Propionat) abzubauen (236) (237) (238). Auch der Abbau langkettiger Fettsäuren in Co-Kulturen von *Methanobacterium formicicum* mit verschiedenen *Syntrophomonas*-Arten konnte gezeigt werden (239) (240) (241). Diese wurden z. T. ebenfalls aus Biogasanlagen isoliert. Demnach ist es wahrscheinlich, dass in Anlage KL der hydrogenotrophen Methanogenese in Syntrophie mit Butyrat- und Propionat-Oxidierern eine größere Bedeutung zukommt, als dem acetiklastischen Weg. Allerdings war in dieser Anlage auch auffällig, dass in etwa die Hälfte der archaeellen Population auf Genus-Ebene nicht näher klassifiziert werden konnte. Ca. 23 % davon konnten mit Hilfe der Silva-Taxonomie der WCHA1-57-Klade (in der Literatur auch als Arc I bezeichnet) zugeordnet werden. Dabei geht die absolute Mehrzahl von den der WCHA1-57-Klade zugeordneten Sequenzen aus Anlage KL (633 von 637) auf lediglich einen OTU (OTU4) und demnach wahrscheinlich auf nur eine Art zurück (Daten nicht gezeigt). Die WCHA1-57-Klade beinhaltet bisher unkultivierte Organismen, die in einzelnen Biogasanlagen bereits gefunden wurden (242) (243) (244). Dabei waren diese Organismen z. T. in großer Zahl vertreten, was mit den Ergebnissen aus Anlage KL übereinstimmt. Die genaue physiologische Funktion dieser Organismen ist derzeit noch nicht geklärt, da bisher noch kein Vertreter dieser Gruppe kultiviert werden konnte. Phylogenetisch erfolgt deren Einteilung derzeit in die Klasse der *Thermoplasmata*. Aufgrund der Vielzahl unkultivierter Vertreter ist diese Klasse bisher nur wenig verstanden. Allerdings suggerieren die hier erzielten Ergebnisse, dass diese Organismen in Biogasanlagen möglicherweise eine wichtige Rolle spielen. Dafür spricht auch, dass dem OTU4 identische Sequenzen bereits in anderen Biogasanlagen gefunden wurden (unveröffentlichte Ergebnisse, (135)). Da bereits eine Anreicherungskultur von WCHA1-57-Organismen gewonnen werden konnte, die mit den Substraten Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid bzw. Formiat kultiviert wurde (242), bilden diese Organismen wahrscheinlich Methan über den hydrogenotrophen Weg. Dennoch werden die Organismen der WCHA1-57-Klade derzeit nicht, wie andere Vertreter der vormals als methanogene *Thermoplasmata* geführten Organismen, den *Methanomassiliicoccales*

(245) (246) zugeordnet, sondern deren Einteilung in eine neue, bisher noch nicht beschriebene Ordnung wird diskutiert (247). Die Resultate der vorliegenden Arbeit sprechen ebenfalls für eine Einteilung dieser Organismen außerhalb der *Methanomassiliicoccales*, da die Sequenzhomologie des entsprechenden OTU4 zu *Methanomassiliicoccus luminyensis* bei lediglich 64 % liegt.

Eine fünfte, in dieser Arbeit untersuchte Anlage (KA) wurde mit kommunalem Abwasserschläm als Substrat betrieben. Trotz der verschiedenen Substrate konnten in der archaeellen Biozönose jedoch große Ähnlichkeiten in den Anlagen KA und KL detektiert werden. So waren die DGGE-Muster beider Anlagen sehr ähnlich und auch in Anlage KA wurden durch Klonierung die Genera *Methanothrix* und *Methanoculleus* als vorherrschend detektiert. Auch in der 454-Amplikonsequenzierung machten diese beiden Genera einen großen Teil der methanogenen Biozönose aus. Jedoch waren auch hier über die Hälfte der Sequenzen auf Genus-Ebene nicht klassifizierbar. Wie auch in Anlage KL gehörte hier ein Großteil der nicht klassifizierbaren Sequenzen der WCHA1-57-Klade an. Deren Anteil war mit ca. 80 % aller nicht klassifizierbaren Sequenzen sogar deutlich höher als in Anlage KL und auch in dieser Anlage ging ein Großteil dieser Sequenzen (3477 von 3495) auf OTU4 zurück. Das deutet darauf hin, dass die durch OTU4 repräsentierte Art der WCHA1-57-Familie in einigen Biogasanlagen optimale Bedingungen vorfindet und vor allem in mit Abwasserschläm betriebenen Anlagen eine wichtige Rolle spielt. In den Anlagen A, B und C konnten hingegen keine Organismen der WCHA1-57-Klade detektiert werden. Allerdings waren vor allem in Anlage B (und in geringerer Zahl auch in den Anlagen A und C) Sequenzen zu finden, die der kürzlich entdeckten Ordnung der Methanogenen, den *Methanomassiliicoccales*, zuzuordnen sind und damit ebenfalls der Klasse der *Thermoplasmata* angehören. Der in der Ordnung einzige, bisher kultivierte Vertreter, *Methanomassiliicoccus luminyensis*, ist zur Methanogenese von Wasserstoff und Methanol (bzw. Methylaminen) befähigt (248) (249). In Anlage B ist *Methanomassiliicoccus* damit der einzige, in nennenswerter Abundanz vorkommende Genus, der zur Verwertung von Methylgruppen befähigt ist. Das Einnehmen dieser ökologischen Nische begründet wahrscheinlich, dass *Methanomassiliicoccus* in Anlage B den zweithäufigsten archaeellen Genus darstellt. In den Anlagen A (im Februar 2015) und C hingegen ist auch *Methanosarcina* in der Lage, Methylgruppen über den Weg der methylotrophen Methanogenese zu verwerten, sodass in diesen Anlagen die relative Abundanz von *Methanomassiliicoccus* deutlich geringer waren.

Um die Biozönosen in den hier untersuchten Biogasanlagen direkt vergleichen zu können, wurden alle analysierten Klone in einen Stammbaum zusammengefasst (Abbildung 47) und auf den einzelnen DGGE-Profilen bzw. auf der 454-Amplikonsequenzierung basierende Dendrogramme erstellt (Abbildung 48).

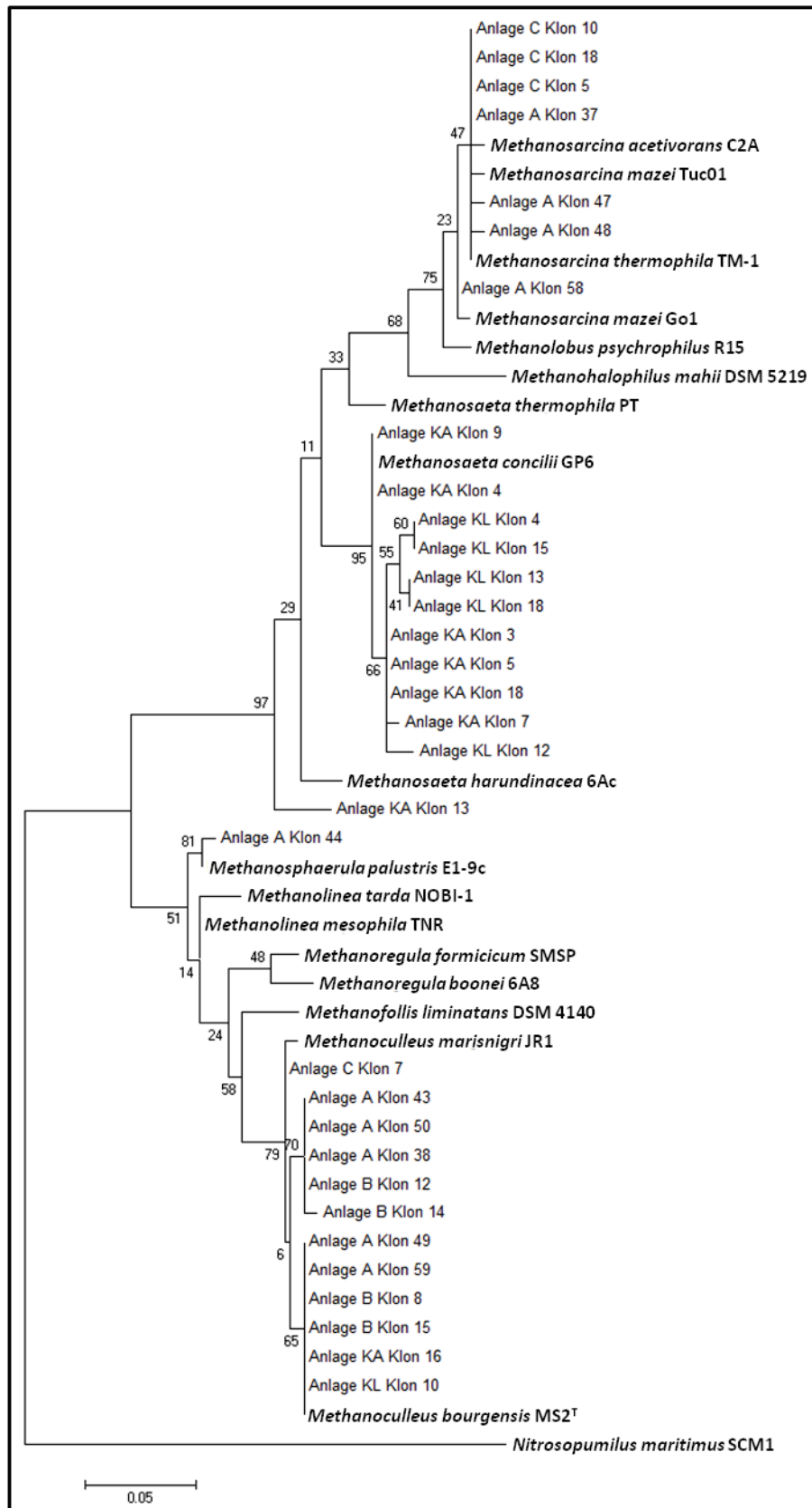


Abbildung 47: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf der Archaea-Klonierung.

Der Stammbaum wurde mit Hilfe der *Maximum Likelihood*-Methode basierend auf dem Jukes-Cantor-Modell mit Hilfe der Software MEGA 5 beta berechnet und ist maßstabsgetreu dargestellt. Zahlen an den Abzweigungen entsprechen den *bootstrap*-Werten nach 250 Wiederholungen.

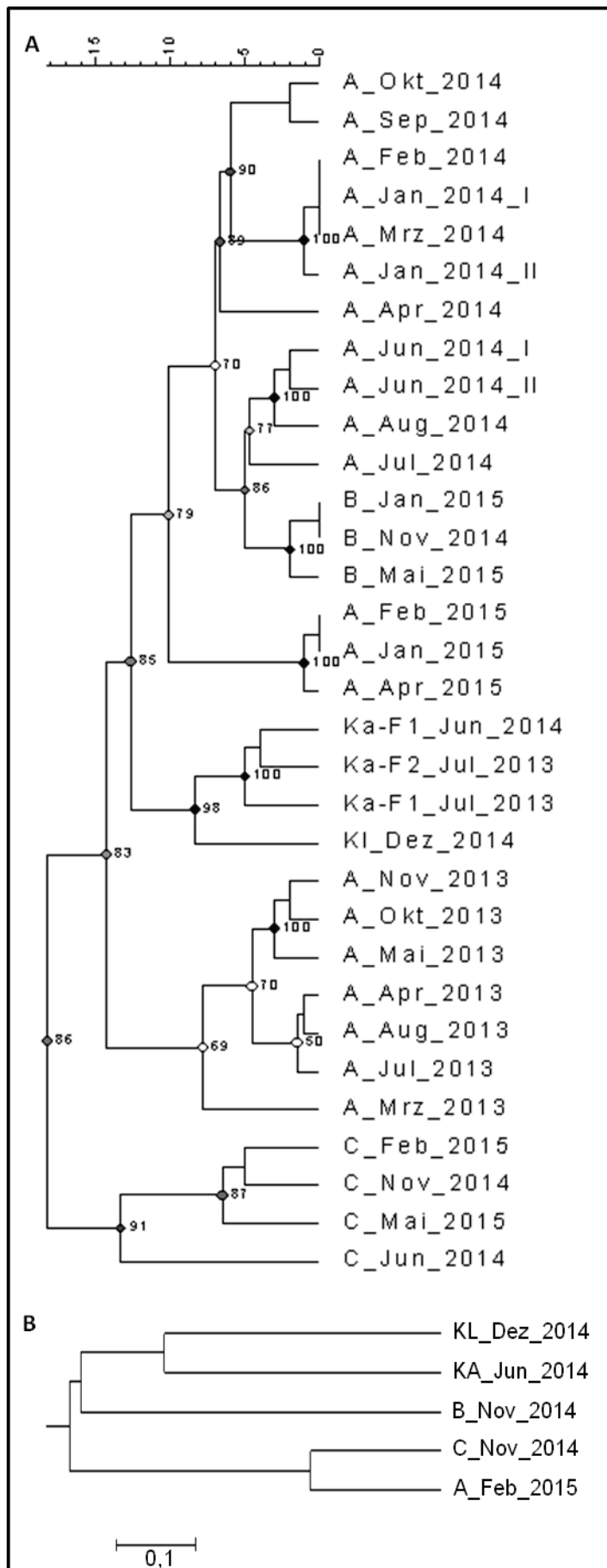


Abbildung 48: Dendrogramme auf Basis der Archaea-spezifischen DGGE-Profile (A) bzw. der 454-Amplikonsequenzierung (B).

Die auf den Archaea-DGGE-Profilen beruhende Clusteranalyse (A) wurde mit Hilfe der Software *Bionumerics v6.0* durchgeführt. Dazu wurde ein Similaritätsindex auf Basis der Anzahl unterschiedlicher Banden berechnet und im Anschluss die Clustering-Methode UPGMA verwendet. Die *bootstrap*-Werte sind an den Abzweigungen angegeben. Der Maßstabsbalken gibt die prozentuale Ähnlichkeit der DGGE-Profile an. Das Dendrogramm auf Basis der 454-Amplikonsequenzierung (B) wurde mit Hilfe der Software *Mothur v1.36.1* unter Verwendung des Yue & Clayton Dissimilaritätsindex berechnet. Die Probenbezeichnung setzt sich aus Anlage_Monat_Jahr der Probenahme zusammen.

Es zeigte sich, dass sich die verschiedenen Klone der einzelnen Anlage sehr ähneln bzw. identisch sind (Abbildung 47). Dementsprechend sind im Stammbaum drei Cluster voneinander zu unterscheiden. In einem ersten Cluster können alle *Methanosarcina*-verwandten Sequenzen aus den Anlagen A und C zusammengefasst werden. Gleichmaßen bilden die DGGE-Profile der Proben, in denen *Methanosarcina* dominant war (Anlage A zwischen März und November 2013 und Anlage C) ein Cluster im Dendrogramm (Abbildung 48 A). Lediglich die Proben aus Anlage A im Jahr 2015 waren davon separiert. Alle *Methanothrix*-verwandten Klone aus den Anlagen KA und KL sind in einem zweiten Cluster zu finden (Abbildung 47) und auch in beiden Dendrogrammen (Abbildung 48 A, B) liegen die Proben aus diesen Anlagen nah beieinander. In einem dritten Cluster im Stammbaum befinden sich alle Sequenzen, die dem Genus *Methanoculleus* zugehörig sind (Abbildung 47). Damit übereinstimmend befanden sich auch alle Proben, in denen *Methanoculleus* als dominantes Archaeon detektiert wurde (Anlage A zwischen Januar und Oktober 2014 sowie Anlage B) in einem Cluster im Dendrogramm (Abbildung 48 A). Anhand beider phylogenetischer Analysen kann geschlossen werden, dass die archaeelle Diversität in allen Biogasanlagen sehr limitiert und auf nur wenige, sehr nah verwandte Mikroorganismen beschränkt ist. Diese wiederum scheinen sich dann, möglicherweise aufgrund ihrer optimalen Anpassung an die vorherrschenden Bedingungen, auch in verschiedenen Anlagen durchzusetzen. So zeigten beispielsweise alle Sequenzen, die dem Genus *Methanoculleus* zugeordnet wurden, eine sehr hohe Ähnlichkeit zu *Methanoculleus bourgensis* MS2^T. Dieser Stamm wurde erstmalig aus einer Biogasanlage isoliert (250) und anhand von Genomanalysen konnten verschiedene physiologische Eigenschaften gefolgert werden, die für eine spezifische Anpassung an die Bedingungen in Biogasanlagen sprechen. Dazu gehören u. a. hoch affine Hydrogenasen, die möglicherweise die effektive Wasserstoffverwertung für den syntrophen Abbau verschiedener Fettsäure-Oxidierer gewährleisten. Zudem hat *Methanoculleus bourgensis* MS2^T das Potential Osmolyte zu produzieren, die eine Anpassung an die jeweiligen Bedingungen ermöglichen (229) (251). Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass *Methanoculleus bourgensis* MS2^T in der Lage ist, in Umgebungen mit höheren Salz- und Ammonium-Konzentrationen zu wachsen (28) (252) (253). Aufgrund dieser physiologischen Eigenschaften ist *Methanoculleus bourgensis* MS2^T optimal an die Bedingungen in Biogasanlagen angepasst, was dessen Vorkommen in allen untersuchten Biogasanlagen erklärt.

Zusätzlich zur Untersuchung der abundantesten Archaeen in den einzelnen Biogasanlagen wurde die Zusammensetzung der *Methanobacteriales* näher untersucht, die aber, mit Ausnahme der Anlage KA, numerisch nur eine untergeordnete Rolle spielen.

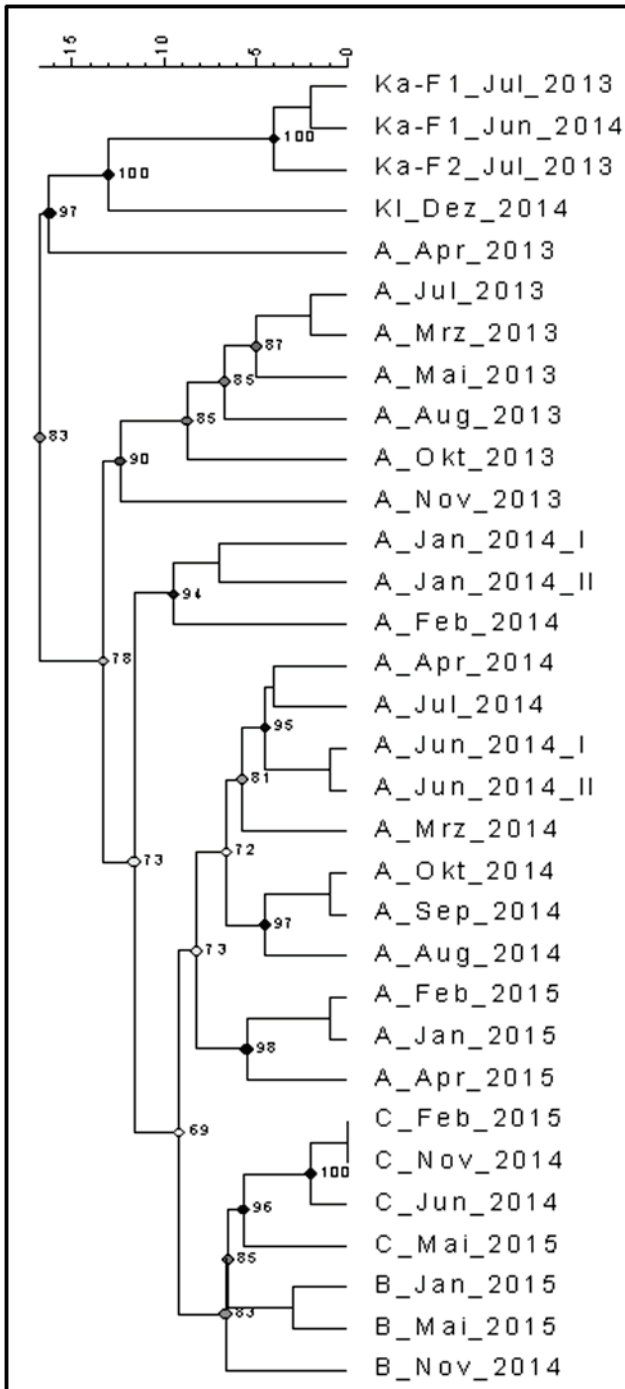


Abbildung 49: Dendrogramm auf Basis der *Methanobacteriales*-spezifischen DGGE-Profil.

Die auf den *Methanobacteriales*-DGGE-Profilen beruhende Clusteranalyse wurde mit Hilfe der Software *Bionumerics* v6.0 durchgeführt. Dazu wurde ein Similaritätsindex auf Basis der Anzahl unterschiedlicher Banden berechnet und im Anschluss die Clustering-Methode UPGMA verwendet. Die *bootstrap*-Werte sind an den Abzweigungen angegeben. Der Maßstabsbalken gibt die prozentuale Ähnlichkeit der DGGE-Profile an. Die Probenberechnung setzt sich aus Anlage_Monat_Jahr der Probenahme zusammen.

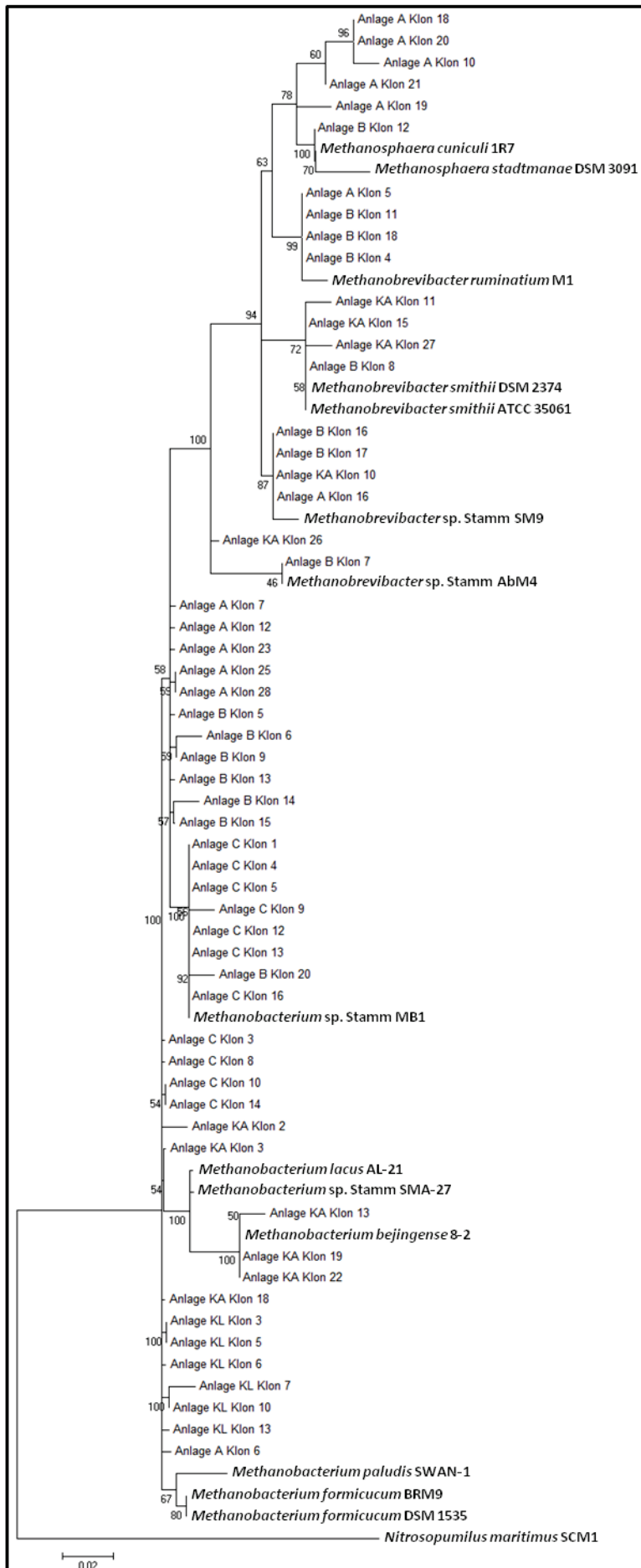


Abbildung 50: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf der *Methanobacteriales*-Klonierung.

Der Stammbaum wurde mit Hilfe der *Maximum Likelihood*-Methode basierend auf dem Jukes-Cantor-Modell mit Hilfe der Software MEGA 5 beta berechnet und ist maßstabsgetreu dargestellt. Zahlen an den Abzweigungen entsprechen den *bootstrap*-Werten nach 250 Wiederholungen.

Am ähnlichsten waren sich dabei die Anlagen A und C, in denen insbesondere Organismen des Genus *Methanobacterium* gefunden wurden. Das wird auch durch das Vorhandensein der gleichen Hauptsignale in der DGGE bestätigt. Daher waren alle Proben der Anlagen A und C in einem gemeinsamen Cluster im DGGE-basierten Dendrogramm zu finden (Abbildung 49). Die einzelnen Klone dieser Anlagen waren sich dabei sehr ähnlich, was deren Auftreten in einem gemeinsamen Cluster im phylogenetischen Stammbaum zeigt (Abbildung 50). Der am nächsten verwandte Organismus dieser Klone ist *Methanobacterium* Stamm MB1. Dieser wurde aus einer Biogasanlage isoliert, die ebenfalls mit Maissilage und Rindermist als Substrate betrieben wird (254). Das deutet auf eine sehr spezialisierte und an Biogasanlagen angepasste Lebensweise dieser Art hin. In Anlage A waren zusätzlich einige Klone zu finden, die zwar hohe Ähnlichkeit zu *Methanosphaera cuniculi* und *Methanosphaera stadtmanae* aufwiesen, jedoch wahrscheinlich einer bisher noch nicht beschriebenen Art angehören. *Methanosphaera cuniculi* ist bisher nur sehr wenig charakterisiert und wurde erstmals im Intestinaltrakt von Hasen gefunden (255). *Methanosphaera stadtmanae* hingegen ist ein typisches Archaeon der menschlichen Darmflora (256) (257), konnte aber auch in sehr geringer Zahl in einer thermophilen Biogasanlage nachgewiesen werden (258). Typisch für beide Arten ist die Methanogenese von Methanol und Wasserstoff. Außerdem konnte gezeigt werden, dass beide Arten Acetat und Kohlenstoffdioxid als Kohlenstoffquelle für ihr Wachstum benötigen, beides aber nicht für die Bildung von Methan nutzen können (255) (256) (257). Diese sehr spezialisierten Bedingungen an das Medium sind möglicherweise ursächlich dafür, dass diese Arten nur in sehr geringer Abundanz in Biogasanlagen vorliegen können. Ob die in dieser Arbeit nachgewiesenen Sequenzen aus Anlage A ebenfalls Organismen dieses Genus repräsentieren, kann nicht festgestellt werden. Aufgrund der hohen Sequenzidentität zwischen 95-96 % mit den beiden bisher bekannten Arten ist dies aber durchaus wahrscheinlich. Im auf den DGGE-Profilen basierenden Dendrogramm ist außerdem auffällig, dass die Proben aus Anlage A vier kleinere Subcluster bilden (März bis November 2013, Januar und Februar 2014, März bis Oktober 2014 und Januar bis April 2015, Abbildung 49). Das zeigt, dass sich auch die Zusammensetzung der *Methanobacteriales* in Abhängigkeit von der Fütterung verschiedener Co-Substrate veränderte.

Die aus Anlage KL isolierten Klone bildeten im phylogenetischen Stammbaum ein separates Cluster (Abbildung 50). Das deutet auf eine zu den Anlagen A und C verschiedene Population der *Methanobacteriales* hin. Tatsächlich wurden in dieser Anlage ausschließlich Organismen des Genus *Methanobacterium* gefunden, die am nächsten mit *Methanobacterium* sp. Stamm SMA-27, *Methanobacterium lacus* und *Methanobacterium formicicum* verwandt waren. Insbesondere letztgenannter ist bereits aus Biogasanlagen bekannt (232) (259) (260) und scheint an die vorherrschenden Bedingungen gut adaptiert zu sein. So ist *Methanobacterium formicicum* beispielsweise in der Lage, sich an osmotischen Stress anzupassen (261).

Die Anlage B ist vor allem durch das Vorhandensein von Organismen des Genus *Methanobrevibacter* geprägt. Zwar befinden sich auch einige Klone dieser Anlage zusammen mit Klonen aus den Anlagen A und C und *Methanobacterium* Stamm MB1 in einem Cluster (Abbildung 50), davon war allerdings nur einer im DGGE-Muster vertreten. Es ist bekannt, dass Organismen des Genus *Methanobrevibacter* sehr abundant im Darm von Hühnern und Rindern vorkommen (216) (262) (263) (264). Damit werden sie mit dem Substrat in großer Zahl in die Biogasanlage eingebracht. Scheinbar sind jedoch die Bedingungen in anaeroben Fermentern für diese Organismen nicht optimal, sodass andere Archaeen favorisiert werden und *Methanobrevibacter* in etablierten Biogasanlagen nur eine geringe Rolle zu spielen scheint. Das Vorkommen von Organismen dieses Genus in Anlage B liegt möglicherweise in der hohen FOS-Konzentration in dieser Anlage begründet. So wurde bereits beschrieben, dass ein Vertreter dieses Genus, *Methanobrevibacter acididurans*, optimal bei leicht saurem pH und hoher FOS wächst und bei Vorhandensein dieses Organismus in Reaktoren mit hohen FOS-Konzentrationen eine höhere Methanbildung zu detektieren ist (265) (266). Die hier detektierten Sequenzen unterscheiden sich zwar von diesem Organismus, es ist jedoch denkbar, dass sie ähnliche Organismen repräsentieren, die ebenfalls tolerant gegenüber hohen FOS-Konzentrationen sind. Trotz der Unterschiede in der Zusammensetzung der Anlagen B und C waren deren DGGE-Profile sehr ähnlich. Es ist demnach nicht auszuschließen, dass die Populationen der *Methanobacteriales* beider Anlagen ähnlicher sind, als zunächst anhand der Klonierung vermutet wurde. So finden sich in beiden Anlagen gleiche Hauptsignale, die nicht sequenziert werden konnten. Es ist wahrscheinlich, dass diese Signale die gleichen Organismen repräsentieren und demnach in beiden Anlagen die gleichen Hauptorganismen vorkommen. Es ist aber auch möglich, dass einige Signale aus mehreren Sequenzen bestehen, die nicht differenziert werden konnten.

In Anlage KA wurden sowohl Organismen des Genus *Methanobrevibacter*, als auch des Genus *Methanobacterium* gefunden. Teilweise konnten die entsprechenden Sequenzen jedoch keiner bisher beschriebenen Art eindeutig zugeordnet werden. Die Klone aus Anlage KA waren im phylogenetischen Stammbaum häufig etwas separiert von den Klonen aus Anlage B und KL (Abbildung 50) und auch im Dendrogramm bilden die Proben dieser Anlage ein eigenes Cluster (Abbildung 49). Demnach zeichnet sich Anlage KA durch eine von den anderen Anlagen unterschiedliche *Methanobacteriales*-Population aus.

Neben der methanogenen Population in den verschiedenen Biogasanlagen konnten mit Hilfe der 454-Amplikonsequenzierung zum Teil auch nicht methanogene Archaeen nachgewiesen werden. So konnten nach der Silva-Taxonomie in den Anlagen C, KA und KL jeweils 31 %, 11 % bzw. 38 % *Crenarchaeota* detektiert werden (bei Verwendung der RDP-Taxonomie waren diese OTUs häufig

nicht klassifiziert). Obwohl sich in den letzten Jahren Studien häufen, in denen das Vorkommen von *Crenarchaeota* in Biogasanlagen in großer Zahl (bis zu 50 % der archaeellen Population) gezeigt werden konnte (244) (267) (268) (269), ist deren physiologische Funktion innerhalb der anaeroben Fermentation noch ungeklärt. Die Mehrzahl (> 99,5 % Anlage C und KL bzw. ca. 95 % Anlage KA) der crenarchaeellen Sequenzen dieser Arbeit wurden, in Übereinstimmung mit Literaturangaben, der Miscellaneous-Crenarchaeota-Gruppe zugeordnet (270). Anhand der Untersuchung der Genomstruktur dieser Organismen wurde ihnen eine Rolle im Abbau aromatischer Verbindungen zugesprochen und deren Einteilung in eine neues Phylum, den „*Bathyarchaeota*“, postuliert (271). In einer weiteren Studie konnte das Potential zum Abbau von Proteinen gezeigt werden (272). Weiterhin wurden Hinweise gefunden, dass diese Organismengruppe zum Abbau pflanzlicher Kohlenhydrate und zur Acetatbildung befähigt ist (273). Es scheint also, dass diese „*Bathyarchaeota*“ an verschiedenen hydrolytischen Prozessen beteiligt sind. Demnach ist es nicht überraschend, dass deren Assoziation mit *Methanoxrhix* sp. bereits gezeigt werden konnte (268). Das Zusammenspiel beider Organismen ermöglicht es, Stoffwechselprodukte (vor allem Acetat) optimal weiter zu geben. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurden „*Bathyarchaeota*“ in allen Anlagen nachgewiesen, in denen *Methanoxrhix* als dominante Spezies vorkommt. Eine enge Interaktion beider Organismen in diesen Anlagen ist also durchaus wahrscheinlich. Es ist außerdem denkbar, dass eine ähnliche Vergesellschaftung zwischen „*Bathyarchaeota*“ und den ebenfalls acetiklastischen *Methanosarcina* möglich ist, da auch in Anlage C ca. 31 % der Archaea als „*Bathyarchaeota*“ identifiziert wurden. Die Tatsache, dass in Anlage A acetiklastische Methanogene nur zu bestimmten Zeitpunkten und in Anlage B gar nicht in nennenswerter Abundanz nachgewiesen wurden, würde demnach das Fehlen der „*Bathyarchaeota*“ in diesen Anlagen erklären. Neben der Beteiligung an verschiedenen Hydrolyseprozessen wurde kürzlich noch eine weitere Funktion dieser Organismen postuliert. Im Rahmen von Metagenomstudien wurden Gene des methylotrophen Methanmetabolismus gefunden. Demnach repräsentieren die „*Bathyarchaeota*“ möglicherweise die erste Organismengruppe außerhalb der *Euryarchaeota*, die zur Methanogenese befähigt sind (274). Trotz des großen Anteils an der archaeellen Population konnten die „*Bathyarchaeota*“ jedoch nicht mit Hilfe der Archaea-DGGE und Klonierung gefunden werden (mit Ausnahme des Klons 15 aus Anlage KA). Es ist denkbar, dass entsprechende Sequenzen durch die verwendeten *Primer* nicht abgedeckt werden, da bereits gezeigt wurde, dass einige allgemeine Archaea-*Primer* crenarchaeelle Sequenzen nur teilweise abdecken (275). Da die in der 454-Amplikonsequenzierung detektierten Sequenzen nur ein Teil des 16S rRNA-Gens abdecken, kann diese Vermutung jedoch nicht eindeutig belegt werden.

Insgesamt konnte in allen untersuchten Anlagen nur eine sehr limitierte Anzahl archaeeller Genera nachgewiesen werden, wie es für Biogasreaktoren typisch zu sein scheint (276) (209) (277).

Ebenso konnte eine ähnliche (278) (279) oder sogar geringere Anzahl archaeeller OTUs (243) (280) (281) (282) im Rahmen verschiedener 16S-Amplikonsequenzierungen nachgewiesen werden. Auch die verschiedenen Diversitätsindices dieser Studien lagen im Bereich der hier bestimmten oder waren sogar geringer. Das deutet darauf hin, dass die archaeelle Population in Biogasanlagen sehr spezialisiert ist und nur wenige Arten, die an die entsprechenden Bedingungen angepasst sind, für eine effektive Methanproduktion verantwortlich sind. Nach der Untersuchung von 44 verschiedenen Biogasreaktoren entwickelten Leclerc *et al.* die Theorie, dass das Vorkommen von sowohl acetiklastischen als auch hydrogenotrophen Methanogenen die minimale archaeelle Population repräsentiert, durch die ein stabiler Biogasprozess gewährleistet werden kann (93). Diese Vermutung kann anhand der hier vorgestellten Ergebnisse nur zum Teil unterstützt werden. Zwar findet sich in den Anlagen C, KA und KL diese Zusammensetzung, in Anlage B sowie in Anlage A zwischen Januar und August 2014 ist jedoch jeweils nur eine beider trophischen Gruppen vorhanden. Dennoch war auch in diesen Anlagen eine stabile Gasproduktion gegeben. Obwohl in den meisten in der Literatur vorgestellten Biogasanlagen tatsächlich sowohl acetiklastische als auch hydrogenotrophe Organismen vertreten sind, gibt es auch einige Ausnahmen, in denen, wie in Anlage A und B, ebenfalls nur eine beider Gruppen absolut vorherrschend ist. So konnten in einem thermophilen, mit biologischen Abfällen betriebenen Biogasreaktor lediglich hydrogenotrophe Methanogene (insbesondere *Methanoculleus*) nachweisen werden (252). Anlagen, in denen ausschließlich acetiklastische Mikroorganismen vorkommen, scheinen nicht vorzukommen. Trotz der absoluten Dominanz dieser Methanogenen in manchen Anlagen, sind im einstelligen prozentualen Bereich ebenso Hydrogenotrophe zu finden (283) (284). Diese Angaben decken sich mit den hier erhobenen Daten, da in den Anlagen A und B ein alleiniges Vorkommen des hydrogenotrophen *Methanoculleus* gezeigt werden konnte, in Anlage C jedoch, trotz der absoluten Dominanz der acetiklastischen Methanosarcinen, ebenso ein geringer Anteil an *Methanoculleus* nachgewiesen wurde.

Der Anteil aller Archaea an der Gesamtpopulation lag in dieser Arbeit in allen Anlagen typischerweise zwischen 10 und 20 %. Lediglich in den Proben mit hoher *Methanosarcina* Abundanz lag der Anteil der Archaea mit ca. 30 % zum Teil höher (Anlage A im Jahr 2015 und Anlage C). In verschiedenen anderen Biogasanlagen wurden in bisherigen Studien sehr unterschiedliche Bacteria:Archaea-Verhältnisse detektiert. So konnten Sundberg *et al.* abhängig vom Substrat 4-15 % Archaea nachweisen, während Regueiro *et al.* sogar bis zu 40 % Archaea beobachteten (15) (169). In einem mit Maissilage und Rindergülle betriebenen Biogasreaktor detektierten Nettmann *et al.* einen Anteil von 17 % Archaea (285). Die in dieser Arbeit ermittelten Bacteria:Archaea-Verhältnisse entsprechen demnach einer typischen Zusammensetzung in Biogasanlagen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Gesamtzahl der Archaeen in Anlage A negativ mit der Konzentration von oTS, FOS und $\text{NH}_4^+\text{-N}$ korreliert. Da eine höhere Raumbelastung (und damit eine steigende oTS-

Konzentration) zum Anstieg von FOS und NH_4^+ -N führt und beide Faktoren Methanogene inhibieren (siehe 1.2.2.3), war diese negative Korrelation zu erwarten. Überraschend ist jedoch, dass diese Parameter kaum Einfluss auf das Verhältnis der einzelnen methanogenen Gruppen hatten und alle Methanogenen gleich betroffen zu sein scheinen, da lediglich die Abundanz von *Methanoculleus* mit NH_4^+ -N negativ korreliert. Vielmehr hatte die Art der Fütterung einen wesentlich größeren Einfluss auf das Verhältnis von *Methanosarcina* und *Methanoculleus*, als die chemischen Parameter. Ausgenommen davon sind jedoch die beiden Störfälle in Anlage A, die im Kapitel 4.4 noch näher diskutiert werden. Zudem konnte in Anlage A tendenziell eine schwache Korrelation der *Methanosarcina*-Abundanz mit der Konzentration gelösten Eisens ermittelt werden. Insbesondere zwischen Januar und August 2014 gingen die Konzentration des gelösten Eisens und parallel dazu die Abundanz von *Methanosarcina* zurück. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Zugabe von Eisen-(III)-chlorid zu einer erhöhten Abundanz von *Methanosarcina* und damit einhergehend zu einer größeren Methanbildung führen kann (286). Dies könnte beispielsweise in der Elimination von biogenen Sulfiden durch Fällung oder durch die Inkorporation dieses Metalls in verschiedene (methanogene) Enzyme erklärt werden (287). Es stellt sich jedoch die Frage, warum selektiv *Methanosarcina* und nicht alle Methanogenen durch die Konzentration an gelöstem Eisen beeinträchtigt wird. Eine Ursache dafür liegt möglicherweise in der Art der Energiekonservierung, die sich in Methanosarcinen grundlegend von der der Hydrogenotrophen unterscheidet. Eine zentrale Rolle spielt dabei das Heterodisulfid (CoM-S-S-CoB) aus den methanogenen Co-Faktoren CoM-SH (2-Mercaptoethansulfonat) und CoB-SH (N-7-Mercaptoheptanoyl-O-Phospho-L-Threonin), das im letzten Schritt der Methanogenese gebildet wird (288) (289). Dieses Heterodisulfid dient *Methanosarcina* sp. als terminaler Elektronen-Akzeptor einer Atmungskette bestehend aus der Methanophenazin-reduzierenden Hydrogenase (bzw. der F_{420}H^2 Dehydrogenase bei Verwertung von MetOH oder Methylaminen) und der membranständigen Heterodisulfidreduktase. Die exergone Reduktion des Heterodisulfids in die Thiole kann durch diese Atmungskette an die Translokation von Protonen gekoppelt werden (290) (291). Der Elektronenfluss wird dabei durch das Vorhandensein von Cytochromen und dem Menaquinon-Analog Methanophenazin ermöglicht (292) (293) (294). Im Gegensatz dazu besitzen Hydrogenotrophe einen löslichen Enzymkomplex aus Heterodisulfidreduktase und der Methylviologen-reduzierenden $[\text{NiFe}]$ -Hydrogenase, der eine Energiekonservierung durch Flavin-abhängige Elektronen-Bifurkation ermöglicht (82) (295). Cytochrome sind in diesen Organismen nicht zu finden. Sowohl die membranständigen Enzyme der Methanosarcinen, als auch die löslichen Enzyme der Hydrogenotrophen enthalten Eisen-Schwefel-Zentren, allerdings müssen Methanosarcinen zusätzlich Eisen-haltige Cytochrome bilden. Aus diesem Grund ist möglicherweise der Bedarf an Eisen als Co-Faktor für *Methanosarcina* höher, als der in Hydrogenotrophen Methanogenen, sodass *Methanosarcina* durch die Verringerung der

Konzentration an gelöstem Eisen im Vergleich zu *Methanoculleus* benachteiligt ist. Allerdings waren die Konzentrationen des gelösten Eisens in Anlage C vergleichbar mit denen aus Anlage A im Jahr 2014 (Daten nicht gezeigt), dennoch war hier *Methanosarcina* der dominierende Genus. Demnach muss auch hier das Zusammenspiel verschiedener Einflussfaktoren angenommen werden.

4.3 Bakterielle Biozönose in Biogasanlagen in Abhängigkeit vom eingesetzten Substrat

Neben der intensiven Untersuchung der archaeellen Biozönose wurde mit Hilfe der 454-Amplikonsequenzierung auch die bakterielle Population exemplarisch in je einer Probe aus jeder Anlage analysiert, um das Bild der mikrobiellen Gemeinschaft in den einzelnen Biogasanlagen zu komplettieren. Auf Phylum-Ebene waren sich dabei erwartungsgemäß alle Anlagen, die mit Maissilage als Hauptsubstrat beschickt werden (A, B, C und KL), sehr ähnlich. Dominierende Phyla waren hier *Firmicutes* und *Cloacimonetes*. Letztgenannte wurden im Jahr 2005 erstmalig in einer Biogasanlage beschrieben und damals der WWE1-Klade zugeordnet. Die taxonomische Einordnung der *Cloacimonetes* erfolgte nahe der *Spirochaetes* (zu denen die entsprechenden OTUs nach der Silva-Taxonomie auch eingruppiert wurden), jedoch als eigenständige monophyletische Gruppe (242). Bereits in dieser Studie wurde die Einordnung dieser Organismen als eigenständiges Phylum postuliert. Seitdem wurden verwandte Organismen auch in anderen Biogasanlagen in großer Zahl gefunden (276) (296). Da jedoch bis heute noch kein Vertreter der *Cloacimonetes* kultiviert werden konnte, wird deren Funktion noch diskutiert. Erste Hinweise zeigen, dass diese Organismen möglicherweise am hydrolytischen oder fermentativen Abbau von Cellulose beteiligt sind (297). Demnach ist es nicht überraschend, dass *Cloacimonetes* in mit Maissilage betriebenen Biogasanlagen zu finden sind. Anhand von Genom-Rekonstruktionen wurde bisher ein Organismus dieses Phylums, „*Candidatus Cloacamonas acidaminovorans*“, beschrieben. In dieser Studie wurde aufgrund des Vorhandenseins entsprechender Gene eine Rolle im syntrophen Abbau von Aminosäuren vermutet. Diese Syntrophie ist möglicherweise auch die Ursache dafür, dass bisher kein Organismus der *Cloacimonetes* kultiviert werden konnte. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um die Rolle dieser Organismen im Rahmen des Biogasprozesses zu klären, insbesondere, da sie in großer Zahl (zwischen 10 und 24 % der bakteriellen Population) in den Anlagen A, C, KA und KL gefunden wurden.

Wie bereits in anderen Studien war das Phylum *Firmicutes* mit 63 bis 83 % aller bakteriellen Sequenzen absolut dominierend in allen mit Maissilage betriebenen Anlagen (298) (209). Ein großer Teil dieser Sequenzen (40-53 %) konnte jedoch bereits auf Ordnungsebene nicht näher klassifiziert werden. Die überwiegende Mehrheit der klassifizierbaren Sequenzen waren den *Clostridiales* zuzuordnen. Insbesondere in landwirtschaftlichen Biogasanlagen scheinen diese Organismen von

großer Bedeutung zu sein, da sie in der Lage sind, sehr effizient Cellulose abzubauen (6) (299) und einige Clostridien-Arten auch am syntrophen Abbau von Fettsäuren beteiligt sind (22) (300). Eine wichtige Familie innerhalb der *Clostridiales* sind die *Ruminococcaceae*, die in allen Anlagen ca. 23-32 % der *Clostridiales* ausmachten. Diese Organismengruppe wurde bisher insbesondere im Verdauungstrakt verschiedener Tiere gefunden (301) (302) (303). Aber auch in Böden konnten bereits *Ruminococcaceae* nachgewiesen werden (304) (305) (306). Deren physiologische Funktion innerhalb dieser Ökosysteme scheint vor allem in der Hydrolyse zu liegen. So konnte bereits gezeigt werden, dass diese Organismen beispielsweise durch die Expression von Glycosyl-Hydrolasen in den Abbau von pflanzlichen Polymeren, wie Cellulose, Lignocellulose und Stärke, involviert sind (306) (307) (308). Aufgrund dieser physiologischen Eigenschaften ist das Vorkommen der *Ruminococcaceae* in landwirtschaftlichen Biogasanlagen durchaus plausibel. Es stellt sich jedoch die Frage, warum Organismen dieser Gruppe bisher nur vereinzelt in Biogasanlagen gefunden wurden (209) (278) (309). Möglicherweise konnten die entsprechenden bakteriellen Sequenzen nicht auf Familien-Ebene aufgelöst und demnach lediglich auf höheren taxonomischen Ebenen in die Ordnung der *Clostridiales* bzw. in die Klasse der *Clostridia* eingruppiert werden. Dennoch ist es wahrscheinlich, dass auch in anderen, ähnlich betriebenen Biogasanlagen die *Ruminococcaceae* eine wichtige Rolle spielen, da sie in großer Zahl durch tierische Faeces in den Biogasprozess eingebracht werden und in verschiedenen Energiepflanzen, wie Mais, ein geeignetes Substrat für ihren Stoffwechsel finden. Interessanterweise konnten in der Zusammensetzung der *Clostridiales* durchaus Unterschiede in den einzelnen Anlagen detektiert werden. So waren insbesondere in den Anlagen C und KL Organismen des Genus *Sedimentibacter* (Familie *Clostridiales_Incertae_Sedis_XI*) zu detektieren. In Anlage B hingegen konnte nur ein geringer Anteil der Sequenzen diesem Genus zugeordnet werden. Im Gegensatz zu vielen anderen Genera der *Clostridiales* sind diese Organismen nicht zur Fermentation von Kohlenhydraten in der Lage (310) sondern verwerten verschiedene Aminosäuren (311) (312). Entstehende Fermentationsprodukte sind dabei vor allem Acetat und Butyrat. Aufgrund dieser physiologischen Eigenschaften scheint *Sedimentibacter* im Rahmen des Biogasprozesses eine wichtige Rolle zu spielen und wurde dementsprechend bereits in anderen Biogasanlagen (278) (313) (314) (315), aber auch in anderen typischen anaeroben Ökosystemen, wie Süßwassersedimenten (316) und Böden (317), gefunden. Eine mögliche Ursache für das unterschiedliche Vorkommen von *Sedimentibacter* in den einzelnen Anlagen ist der Eintrag verschiedener Proteinanteile mit dem Substrat. So wurde Anlage B mit nur 29 % tierischen Faeces und 71 % Energiepflanzen beschickt, während in Anlage C 40 % des Substrates aus tierischen Faeces bestand. Allerdings waren in den Anlagen A und KL jeweils die Anteile an tierischen Faeces mit 33 bzw. 34 % nur geringfügig höher als in Anlage B, sodass auch noch andere unbekannte Einflussfaktoren in diesen Anlagen das Vorkommen von *Sedimentibacter* begünstigen. Des Weiteren konnten vor allem in den Anlagen B

und C Organismen der Familie *Clostridiaceae_1* (Genus *Clostridia sensu stricto*) nachgewiesen werden. Innerhalb dieser nicht monophyletischen Gruppe werden derzeit zum Teil sehr verschiedene Organismen eingeordnet, die möglicherweise zukünftig in eigenständige Familien eingruppiert werden (318) (319). Deren physiologische Eigenschaften sind sehr vielfältig. Fast allen ist aber gemein, dass sie neben verschiedenen organischen Säuren und Alkoholen vor allem Butyrat als wichtigstes Fermentationsprodukt bilden (318). Demnach scheint die Acido- und Acetogene Population bei der anaeroben Fermentation von Maissilage insbesondere durch die Genera *Sedimentibacter* und *Clostridia sensu stricto* gebildet zu werden. Es ist überraschend, dass syntrophe Organismen hingegen nur in sehr geringer Zahl nachgewiesen wurden. So waren in allen Anlagen unter 10 % aller *Clostridiales* der Familie der *Syntrophomonadaceae* zuzuordnen. Es ist denkbar, dass bereits durch primäre Fermentation genügend Wasserstoff für die Hydrogenotrophen im System gebildet wird. Möglicherweise spricht der geringe Anteil syntropher Organismen aber auch für eine ineffektive Hydrolyse in den einzelnen Anlagen, sodass nicht genügend Substrat für die Syntrophen zur Verfügung steht. Vor allem in landwirtschaftlichen Biogasanlagen wird davon ausgegangen, dass die Hydrolyse aufgrund des hohen Anteils an schwer vergärbaren Substanzen im Substrat den Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt darstellt (siehe 1.1.1). Eine Ursache dafür könnte der geringe Anteil an *Bacteroidetes* in den hier untersuchten Anlagen sein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass in Anlage A im Vergleich zu natürlichen Systemen (Faeces oder Intestinaltrakt herbivorer Tiere) deutlich weniger *Bacteroidetes* und dafür mehr *Firmicutes* vorkommen und gleichermaßen weniger cellulolytische Enzyme (Glycosid-Hydrolasen und Kohlenhydrat-Esterasen) zu finden waren (320). Auf Grundlage dieser Daten wurde diskutiert, dass durch den geringeren Anteil der *Bacteroidetes* die Hydrolyse im Biogasreaktor ineffektiver abläuft als in natürlichen Systemen und die Hydrolyserate in landwirtschaftlichen Biogasanlagen durch Erhöhung der Abundanz der *Bacteroidetes* gesteigert werden könnte. Bei geringer Hydrolyserate verlaufen alle nachfolgenden Schritte des anaeroben Abbaus nicht mit maximaler Kapazität. Dafür spricht auch, dass in den Anlagen A, B und C bereits gezeigt werden konnte, dass die hydrogenotrophe Methanproduktion durch Zugabe von Wasserstoff stimuliert werden kann (207). Natürlich ist es denkbar, dass einige der nicht klassifizierbaren OTUs weitere Syntrophe Organismen repräsentieren. Es ist jedoch auch möglich, dass in den einzelnen Anlagen die syntrophe Acetat Oxidation (SAO) stattfindet. In verschiedenen mesophilen Biogasanlagen konnte bereits gezeigt werden, dass die SAO eine wichtige Rolle spielt (24) (321) (322). Insbesondere hohe Konzentrationen an Ammonium und FOS, wie sie in den Anlagen A und B zu finden sind, scheinen die SAO zu begünstigen (322). In diesen Anlagen ist eine Vergesellschaftung von *Methanoculleus* sp. mit syntrophen Acetat oxidierende Bakterien denkbar. Außerdem findet die SAO häufig in Biogasanlagen mit hohen hydraulischen Verweilzeiten (HRT) statt (323), wie es in Anlage C der Fall ist. Bislang sind, neben thermophilen Vertretern,

lediglich zwei mesophile (*Clostridium ultunense* und *Syntrophaceticus schinkii*) und ein thermotolerantes Bakterium (*Tepidanaerobacter acetatoxydans*) bekannt (22) (24) (324) (325), die zur SAO befähigt sind und zur Klasse der *Clostridia* zählen. Durch Vergleich sehr abundanter, nicht näher klassifizierbarer OTUs mit diesen Organismen konnte jedoch jeweils nur eine Sequenzidentität von unter 85 % ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). Dennoch ist es möglich, dass bisher unbekannte Bakterien die SAO in den hier untersuchten Anlagen durchführen. In Anlage KL hingegen scheint ein Beitrag der SAO zur Produktion von Wasserstoff unwahrscheinlich, da bereits postuliert wurde, dass die SAO lediglich in Abwesenheit von *Methanothrix* den dominierenden Weg des Acetat-Abbaus darstellt (26).

Erwartungsgemäß unterschied sich die bakterielle Population in der mit kommunalem Abwasserschlämmbetriebenen Anlage KA deutlich von den NawaRo-Anlagen A, B, C und KL. So machten die *Firmicutes* in dieser Anlage lediglich ca. 21 % der gesamten bakteriellen Population aus. Die Zusammensetzung der *Clostridiales* war zwar weitestgehend mit denen der übrigen Biogasreaktoren ähnlich, jedoch konnten hier zusätzlich Organismen des Genus *Gracilibacter* detektiert werden. Die einzige bisher beschriebene Art dieses Genus, *Gracilibacter thermotolerans*, produziert durch fermentativen Abbau verschiedener Kohlenhydrate insbesondere Acetat, Lactat und Ethanol (326) und ist damit der Acidogenese-Stufe zuzuordnen. Bisher konnten Verwandte dieses Genus nur in wenigen Biogasanlagen nachgewiesen werden. (243) (327). Der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene OTU glich mit 96 % Sequenzidentität *Gracilibacter thermotolerans* und repräsentiert demnach möglicherweise eine zweite Art des Genus *Gracilibacter*.

Das abundanteste Phylum in Anlage KA waren mit ca. 28 % aller bakteriellen Sequenzen die *Proteobacteria*. Mit 41 % davon stellen die *Deltaproteobacteria* die abundanteste Klasse dar. Insbesondere zu nennen ist hier die Familie der *Syntrophaceae* mit dem Genus *Smithella*. Dieser ist in Co-Kultur mit Methanogenen (wie *Methanospirillum*) zum syntrophen Abbau von Propionat unter Bildung von Acetat, Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff befähigt (328) und wurde bereits in anderen Biogasanlagen gefunden (329). Demnach ist die syntrophe Population in Anlage KA deutlich ausgeprägter als in den übrigen Anlagen. Daneben konnten ca. 30 % aller *Proteobacteria* den *Betaproteobacteria* zugeordnet werden. Auch diese Organismengruppe ist sehr häufig in Biogasanlagen zu finden (329) (330) (331). Überraschend ist jedoch, dass die große Mehrzahl der entsprechenden OTUs sowohl durch RDP als auch Silva den *Comamonadaceae* zugeordnet wurden (Daten nicht gezeigt). Bisher bekannte Organismen dieser Familie (eingeschlossen der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Genera *Acidovorax*, *Comamonas* und *Simplicispira*) sind abhängig von der Nutzung von Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor (332), was ein Vorkommen in anaeroben Habitaten unwahrscheinlich macht. Dennoch wurden bereits in anderen Biogasanlagen *Comamonadaceae* (9) bzw. Sequenzen, die mit den hier detektierten OTUs übereinstimmen (135)

(242) (243), gefunden. Es ist möglich, dass diese Sequenzen bisher unbekannte Organismen repräsentieren, die zwar, wie andere *Comamonadaceae* Aminosäuren abbauen, aber (fakultativ) anaerob sind. Außerdem ist bekannt, dass *Comamonadaceae* in der Abwasserbehandlung (insbesondere als Phosphor-akkumulierende und Nitrat- abbauende Organismen) eine wichtige Rolle spielen (333) (334) (335). Es ist also denkbar, dass diese Organismen mit dem Substrat in den Biogasreaktor eingetragen werden, aber möglicherweise inaktiv vorliegen, sodass sie durch die 454-Amplikonsequenzierung zwar erfasst werden, jedoch keine Rolle im Biogasprozess spielen.

4.4 Veränderungen der mikrobiellen Population durch Prozessstörungen

Obwohl Biogasanlagen in der Regel sehr intensiv überwacht und die Stabilität einer Vielzahl von chemischen Parametern regelmäßig geprüft wird, kommt es immer wieder zu Störungen des Prozesses und damit zu Einbußen in der Methanproduktion. Um die mikrobiellen Prozesse während solcher Störfälle besser zu verstehen und daraus gegebenenfalls vorbeugende Maßnahmen ableiten zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit die beiden häufigsten Formen der Prozessstörung (Ammonium-Intoxikation und Säureakkumulation) simuliert und die mikrobielle Biozönose in verschiedenen Stadien der Störung charakterisiert.

Im Rahmen der Ammonium-Intoxikation veränderte sich die archaeelle Biozönose zunächst trotz erhöhter Ammoniumkonzentration nicht. Im zweiten Ammoniumversuch konnte zwar eine deutlicher Rückgang in der Methanproduktion (auf ca. 50 % der normalen Methanbildungsrate in der leichten Hemmung und 10 % in der schweren Hemmung, persönliche Mitteilung Dipl. Biol. Tobias Kern, Technische Universität Dresden) gemessen werden, die Zusammensetzung der archaeellen Population blieb jedoch konstant. Auch im ersten Ammoniumversuch konnten bei NH_4^+ -N-Konzentrationen von bis zu 10 g/l (leichte Hemmung) zunächst keine Veränderungen in der Biozönose detektiert werden. In Übereinstimmung mit diesen Resultaten konnten auch Poirier *et al.* bei Ammoniumkonzentrationen bis zu 10 g/l lediglich geringfügige Veränderungen der archaeellen Population über einen Zeitraum von 57 Tagen beobachten, obwohl auch hier die Methanbildung bereits rückläufig war (336). Das deutet darauf hin, dass einzelne Organismen zunächst durch Verringerung ihrer Aktivität auf physikochemische Veränderungen im System reagieren. Um dennoch frühzeitig den Beginn von Prozessstörungen zu erkennen scheint es daher sinnvoll, mikrobielle Aktivitätsparameter, wie etwa Enzymaktivitäten, zu kontrollieren. Frühere Studien zeigten, dass dafür die gesamt-Hydrogenase-Aktivität (die Aktivität aller Mikroorganismen repräsentierend) oder die Esterase-Aktivität (die heterotrophe bakterielle Aktivität repräsentierend) geeignet sind (207) (337). Für die Darstellung der archaeellen Aktivität könnte zukünftig möglicherweise die F_{420} -abhängige Hydrogenase Aktivität genutzt werden (207). Im Rahmen dieser Arbeit konnte also gezeigt

werden, dass sich bei kurzzeitiger Störung die Archaea (wahrscheinlich durch Regulation ihrer Aktivität) durchaus auch an höhere NH_4^+ -N-Konzentrationen anpassen können. Eine erfolgreiche Regeneration der Methanbildung konnte nach Erhöhung der NH_4^+ -N-Konzentration auf bis zu 5 g/l gezeigt werden (persönliche Mitteilung Dipl. Biol. Tobias Kern, Technische Universität Dresden).

Veränderungen in der Zusammensetzung der Archaea konnten erst nach längerem Vorherrschen der erhöhten NH_4^+ -N-Konzentration beobachtet werden. So scheint bei einer NH_4^+ -N-Konzentration von 10 g/l die Anpassungsfähigkeit des Systems erschöpft zu sein, sodass in der „Erholung“ (Ammonium-Intoxikation I) kein Rückgang der Ammoniumkonzentration detektiert wurde und demnach keine Regeneration mehr möglich war. Daraufhin veränderte sich auch die Zusammensetzung der archaeellen Biozönose. So konnten in der DGGE in der „Erholung“ (Ammonium-Intoxikation I), ähnlich wie in der schweren Hemmung, zusätzliche Signale detektiert werden, die zum Teil den Genera *Methanoculleus* und *Methanosarcina* zuzuordnen waren, bzw. nicht identifiziert werden konnten. Außerdem waren die Signalintensitäten des typischen DGGE-Musters vor allem in der „Erholung“ deutlich schwächer, was auf die Abnahme der relativen Abundanz der typischen methanogenen Population hinweist. In Übereinstimmung mit der DGGE konnte auch mit Hilfe der 454-Amplikonsequenzierung eine deutlich veränderte archaeelle Population in der schweren Hemmung und „Erholung“ (Ammonium-Intoxikation I) festgestellt werden. Die Zusammensetzung der Archaea war dabei in beiden Proben vergleichbar. Interessanterweise ging vor allem der Anteil von *Methanoculleus* stark zurück, obwohl für diese Art häufig eine gute Toleranz gegenüber Ammoniumstress beschrieben wurde. Dementsprechend ist in Fermentern mit erhöhter Ammoniumkonzentration oft eine hohe Abundanz von *Methanoculleus* zu detektieren (338). Aus diesem Grund wurde der Einsatz von *Methanoculleus* spp. als Bioaugmentationssystem bei Verwendung Ammonium-reicher Substrate beschrieben (339). Neben dem Rückgang von *Methanoculleus* konnte jedoch auch ein relativer Anstieg der Genera *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* und *Methanosphaera* beobachtet werden. Demnach scheinen verschiedene *Methanobacteriaceae* eine erhöhte Ammoniumtoleranz aufzuweisen (340) (341). Da jedoch im *Methanobacteriales*-spezifischen DGGE-Profil in der schweren Hemmung einige Signale fehlten, sind wahrscheinlich nur einzelne Spezies in der Lage, diese erhöhten Ammoniumkonzentrationen zu tolerieren. Insgesamt zeigte sich in den Proben der schweren Hemmung und „Erholung“ eine deutliche Erhöhung der Diversität im Vergleich zur Kontrolle und leichten Hemmung. Durch eine so entstehende funktionelle Redundanz kann das Adaptionspotential der gesamten archaeellen Gemeinschaft gegenüber Stressoren erhöht werden (212) (342). Eine Korrelation zwischen Biodiversität und Stabilität des Systems als ökologisches Prinzip wird derzeit diskutiert (343) (344) (345) und liegt möglicherweise der im Rahmen dieser Arbeit beobachteten erhöhten Diversität nach Ammoniumhemmung zugrunde. Trotz des Anstiegs der relativen Anteile verschiedener

archaeeller Genera in der schweren Hemmung und „Erholung“, sank die absolute Anzahl der Archaea jedoch um ca. zwei Größenordnungen. Die Prozessstörung war demnach zu gravierend, um durch die mikrobielle Biozönose ausgeglichen werden zu können.

Basierend auf den Ergebnissen der beiden Ammonium-Hemmversuche könnte man demnach 8-10 g/l NH_4^+ -N als kritische Ammoniumkonzentration betrachten, ab der es zu Veränderungen in der archaeellen Biozönose kommt. Es stellt sich jedoch die Frage, ob dieser Grenzwert auch im wesentlich größeren kommerziellen Biogassystem anwendbar ist. So wurden beispielsweise in Anlage A im Oktober und November 2013 ebenfalls erhöhte NH_4^+ -N-Konzentrationen von bis zu 5,8 g/l detektiert. Obwohl in den im Labormaßstab simulierten Hemmversuchen bei dieser Konzentration noch keine Auswirkungen auf die archaeelle Biozönose zu beobachten waren, wurde in Anlage A bereits ein Rückgang in der Abundanz der Archaea beobachtet, sowohl *Methanoculleus* als auch *Methanosarcina* betraf. Gleichzeitig konnte in diesem Zeitraum ein leichter Rückgang der Methanbildungsrate beobachtet werden (persönliche Mitteilung Dipl. Biol. Sarah Refai, Universität Bonn). Es scheint demnach nicht möglich, allgemein gültige Grenzkonzentrationen an Ammonium für den Biogasprozess festzulegen. Tatsächlich wird derzeit diskutiert, ab welcher Konzentration Ammonium toxisch wirkt. Bisher wurden in verschiedenen Studien inhibitorische Effekte ab Konzentrationen zwischen 1,5 und 14 g/l Ammonium-Stickstoff beobachtet (7) (65). Es müssen demnach noch eine Reihe anderer Faktoren, wie die Substratzusammensetzung, die Pufferkapazität des gesamten Systems, der pH-Wert aber auch die Prozessführung und -temperatur eine wichtige Rolle spielen. Außerdem reagieren natürlich auch unterschiedlich zusammengesetzte mikrobielle Populationen verschieden sensitiv auf Veränderungen in der Ammoniumkonzentration. Dabei ist jedoch noch nicht abschließend geklärt, ob hydrogenotrophe oder acetiklastische Organismen sensitiver gegenüber Ammoniumstress sind. So konnte bereits gezeigt werden, dass hydrogenotrophe Methanogene im mesophilen Reaktorbetrieb Ammonium besser tolerieren können, als acetiklastische (346). Auch in thermophilen Anlagen konnte eine Halbierung der Wachstumsraten von acetiklastischen Archaea bereits bei 3,5 g/l Ammonium beobachtet werden, während die Wachstumsrate der Hydrogenotrophen erst bei 7 g/l Ammonium halbiert war (347). Im Gegensatz dazu wurde in anderen Biogasanlagen (mesophil als auch thermophil) eine Dominanz von *Methanosarcina* bei Ammoniumkonzentrationen von 7 g/l gezeigt (348) (349). Es ist demnach wahrscheinlich, dass unter anderem die unterschiedliche Zusammensetzung der archaeellen Population in Anlage A (dominierend waren *Methanoculleus* und *Methanosarcina*) im Vergleich zum zweiten Ammonium-Intoxikations-Versuch (alleinige Dominanz von *Methanosarcina*) ausschlaggebend für die unterschiedliche Reaktion auf die erhöhte Ammoniumkonzentration ist. Die Tatsache, dass *Methanosarcina* sp. häufig als sehr robuste Methanogene beschrieben werden und diese Organismen auch sehr vielseitig in der Substratverwertung sind (350), unterstützt diese

Theorie. Allerdings sank in Anlage A die Abundanz der Methanosarcinen ebenso wie die von *Methanoculleus*. Dies ist möglicherweise auf das Fehlen von Spurenelementen zurückzuführen, da im September 2013 die Zugabe zusätzlicher Spurenelementen eingestellt wurde, diese aber insbesondere bei der Fermentation von Maissilage von großer Bedeutung sind (38) (47) (53). Auffällig war außerdem, dass insbesondere im Oktober und November 2013 deutlich erhöhte Konzentrationen an Sulfat-Schwefel gemessen wurden (79 mg/l). Obwohl in der Literatur erst inhibitorische Effekte ab einer Sulfat-Schwefelkonzentration von 100 mg/l beobachtet wurden (351), ist es durchaus vorteilbar, dass auch dieses Sulfat (bzw. daraus durch Reduktion entstehende Sulfide) zum Rückgang der Archaea in diesem Zeitraum beigetragen hat.

Zusätzlich zur archaeellen Population wurde im Rahmen des ersten Versuchs zur Ammonium-Intoxikation auch die bakterielle Biozönose untersucht. Im Gegensatz zur Zusammensetzung der Archaea konnten hier jedoch nur geringfügige Veränderungen detektiert werden. Das deutet darauf hin, dass Bacteria im Allgemeinen anpassungsfähiger gegenüber Ammoniumstress sind, als Archaea. Diese Beobachtung deckt sich mit anderen Studien, in denen häufig die Stress-induzierte Hemmung des Biogasprozesses aufgrund der Sensibilität der Archaeen und nicht der Bacteria beschrieben wird (352) (353). Innerhalb der Bacteria war in der „Erholung“ der Anteil der *Ruminococcaceae* deutlich geringer, als in den übrigen Proben. Das deutet darauf hin, dass diese Organismengruppe besonders sensibel auf lang anhaltenden Ammoniumstress reagiert. Außerdem war in der „Erholung“ der Anteil der bisher unbekannten *Clostridiales* mit über 70 % besonders hoch. Bei länger anhaltenden Stressbedingungen kommt es also durchaus auch zur Umstellung der bakteriellen Population. Es ist denkbar, dass sich unter diesen Organismen vor allem auch bisher unbekannte syntrophe Acetat-oxidierende Bakterien befinden. Außerdem ist bekannt, dass es vor allem bei hoher Ammoniumkonzentration zur Umstellung des Elektronenflusses von der acetiklastischen Methanogenese zur SAO kommen kann (27). Da bisher nur wenige Bakterien bekannt sind, die zu diesem Stoffwechselweg befähigt sind, könnten einige der nicht klassifizierbaren OTUs entsprechende Organismen repräsentieren.

Eine zweite, vielfach auftretende Form der Prozessstörung ist die Akkumulation von Säuren im Reaktor. Häufig wird diese durch „Überfütterung“, das heißt steigender OLR, verursacht. Zur Simulation einer solchen Situation wurden in einem ersten Versauerungsversuch die Versuchsreaktoren zusätzlich zur normalen Fütterung mit Glucose beschickt. Das hatte zwar einen geringfügigen Anstieg der Essigsäurekonzentration zur Folge, jedoch konnte dadurch ein positiver Einfluss auf den Biogasprozess detektiert werden (die Methanbildungsrate stieg um mehr als das Dreifache, persönliche Mitteilung Dipl. Biol. Tobias Kern, Technische Universität Dresden). Da die Methanogenen in diesem System, ihre metabolische Kapazität nicht vollständig nutzen, konnte ein

Großteil des durch die schnelle Vergärung der Glucose entstehenden Acetats demnach sofort zu Methan umgesetzt werden. Obwohl in diesen Proben *Methanoculleus* dominierend ist und die acetiklastischen Methanosarcinen weniger als 10 % der Archaea ausmachen, scheint hier vor allem der acetiklastische Weg eine besondere Rolle zu spielen. Das deutet darauf hin, dass *Methanosarcina* die geringe numerische Abundanz bei steigender Substratkonzentration durch erhöhte metabolische Aktivität ausgleichen kann. Ähnliche Effekte konnten bereits bei der Analyse anderer Biogasanlagen beobachtet werden (49) (354). Im Rahmen des ersten Versauerungsversuches konnte die Überfütterung mit Glucose durch den selektiven Anstieg der Aktivität einzelner Mikroorganismen ausgeglichen werden, sodass es nicht zu einer Prozessstörung sondern sogar zu einem Anstieg der Methanbildung kam.

In einem zweiten unabhängigen Versauerungsversuch wurde dann eine Überfütterung durch zusätzliche Beschickung mit Speiseöl induziert. Interessanterweise kam es dabei nur in einem der beiden parallelen Reaktoren („Versauerung“) zur Akkumulation von Säuren, während in einem zweiten Reaktor („Erholung“) die Konzentration der Säuren auf dem Niveau der Kontrollen blieb. Auch in anderen Biogasanlagen wurde bereits beobachtet, dass sich in parallel betriebenen Reaktoren unterschiedliche FOS-Konzentrationen einstellten. Dies konnte auf unterschiedliche mikrobielle Populationen zurückgeführt werden, die sich trotz der Verwendung des selben Inokulums ausbildeten (355). Es stellt sich also die Frage, ob auch im Rahmen des zweiten Versauerungsversuches Unterschiede in der mikrobiellen Biozönose zum unterschiedlichen Verhalten beider Reaktoren geführt haben. Entgegen den Erwartungen konnten jedoch in DGGE, qPCR und CARD-FISH keine wesentlichen Unterschiede in der archaeellen Gemeinschaft detektiert werden. Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass es bei erhöhter Konzentration prozessrelevanter Säuren nur zu geringfügigen Veränderungen der archaeellen Zusammensetzung kommt (356). Es ist also anzunehmen, dass bereits minimale Veränderungen in der Zusammensetzung der Archaea die Stabilität des Prozesses gegenüber Säurestress entscheidend beeinflussen. Tatsächlich konnte mit Hilfe der sensitiveren 454-Amplikonsequenzierung gezeigt werden, dass in der versauerten Probe der Anteil der Methanosarcinen mit ca. 78 % der Archaea geringer war, als in den übrigen Proben (über 90 %), während der Anteil von *Methanobacterium* auf ca. 20 % anstieg. Demnach scheint *Methanosarcina* eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Biogasprozesses bei beginnender Säureakkumulation zu spielen. Zu einem ähnlichen Schluss kamen auch Shin *et al.*, deren Versuche zeigten, dass *Methanosarcina* für eine zumindest moderate Prozesseffizienz bei hoher OLR wichtig ist (357). In Übereinstimmung mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit konnte ebenso gezeigt werden, dass bei erhöhter OLR und damit einhergehenden erhöhten FOS-Konzentrationen zunächst *Methanosarcina* zur Prozessstabilität beiträgt und schließlich das Auftreten einer Prozessstörung mit einer erhöhten Abundanz an

Methanobacteriales assoziiert ist (219). Dem gegenüber stehen jedoch Studien, in denen den *Methanobacteriales* eine erhöhte Toleranz gegenüber Säurestress zugesagt wird. So konnte beispielweise eine erhöhte Abundanz von *Methanobacteriales* bei erhöhten OLR beobachtet werden, die nicht negativ durch erhöhte Säurekonzentrationen bzw. verringerten pH-Wert beeinflusst wurden (358). Gleichmaßen konnte während der Anlaufphase eines Laborfermenters gezeigt werden, dass bei erhöhten Acetatkonzentrationen von bis zu 8 g/l die Aktivität der *Methanobacteriales* steigt (359). Dennoch bestätigen die Resultate dieser Arbeit die in der Literatur häufig beobachtete Tendenz, dass bei erhöhter OLR bzw. FOS-Konzentration der Anteil hydrogenotropher Methanogener steigt (48) (353) (355). Ob dies jedoch zur verbesserten Toleranz des Biogasprozesses gegenüber Säurestress (beispielsweise durch den verbesserten syntrophen Abbau der FOS) führt, oder ein Anzeichen für Prozessinstabilität ist, kann nicht abschließend geklärt werden. Demnach ist das Monitoring der archaeellen Population nicht immer geeignet, um Prozessstörungen frühzeitig zu erkennen.

Ähnlich wie bei der Diversität der Archaea konnten auch bei Untersuchung der Bacteria nur geringfügige Veränderungen der Population detektiert werden. Auffällig war dabei vor allem, dass der Anteil der *Syntrophomonadaceae* in der nicht versauerten Erholung etwa dreimal höher war, als in der Versauerung. Der durch diese Organismen vermittelte verbesserte Abbau der FOS scheint also deren Akkumulation entgegen zu wirken. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis konnte bereits bei der anaeroben Fermentation von Nahrungsmitteln ein Anstieg von *Syntrophomonas* beobachtet und dessen bessere Toleranz gegenüber Säurestress wurde vermutet (360). Ebenso konnte auch in einem thermophilen Reaktor ein *Syntrophomonas*-ähnlicher Organismus in Assoziation mit erhöhter OLR und FOS-Konzentration nachgewiesen werden (361). Außerdem wurde, um den Prozess des Säureabbaus zu begünstigen, die Zugabe von Propionat-abbauenden Anreicherungskulturen als Bioaugmentationssystem erfolgreich angewendet (362). Es ist denkbar, dass ähnliche Erfolge auch mit Organismen zum Abbau anderer prozessrelevanter Säuren erzielt werden könnten. Dennoch ist dabei zu beachten, dass das Prinzip der Syntrophie ein sehr sensibles System darstellt, dass leicht gestört werden kann. So zeigten Regueiro *et. al.* im Gegensatz zu den hier dargestellten Ergebnissen eine Verringerung der *Syntrophomonadaceae* in Korrelation mit steigender FOS-Konzentration (363). Es ist denkbar, dass es hier durch die erhöhte Säurekonzentration schon zur Schädigung des hydrogenotrophen Syntrophie-Partners kam, sodass kein erfolgreicher Abbau der FOS mehr stattfinden konnte und demnach auch die Abundanz der syntrophen Bakterien abnahm. Eine mögliche Ursache, dass es in der Erholung zur ausreichenden Ausprägung der Syntrophie kam, liegt in der Anpassung der entsprechenden Organismen. So sollte im Verlauf des Versuches zunächst durch die Zugabe von „corn cob mix“ (CCM) ein Versauern des Reaktors induziert werden. Bevor jedoch Auswirkungen auf die Methanbildung im Reaktor gemessen werden konnten, kam es zu

starker Schaumbildung sodass im Anschluss die Versauerung durch Zugabe von Speiseöl simuliert wurde. Es ist denkbar, dass durch diesen Versuchsablauf eine Akklimation stattgefunden hat, die zur erhöhten Säuretoleranz der syntrophen Gemeinschaft geführt hat. Warum diese Anpassung jedoch in den Reaktoren der Versauerung und Erholung, trotz Verwendung desselben Ausgangsmaterials, unterschiedlich ausgeprägt war, kann nicht geklärt werden. Auffällig ist auch, dass die Diversität im versauerten Reaktor, wie sie durch den inversen Simpson-Index charakterisiert ist, deutlich geringer ist, als in den übrigen Reaktoren. Es ist schwer abschätzbar, ob diese Unterschiede in der Diversität das Resultat oder die Ursache für die Versauerung sind. Allerdings ist es denkbar, dass die geringere Diversität in der Versauerung mit einer verringerten Widerstandsfähigkeit dieses Fermenters einhergeht, wie es bereits im Rahmen der Ammonium-Intoxikation diskutiert wurde.

Neben der Erhöhung der OLR kann auch eine plötzliche Verringerung der oTS im Fermenter ein Ungleichgewicht des Biogasprozesses auslösen. Eine solche Prozessstörung trat in Anlage A im April 2014 auf. Aufgrund von Störungen im Blockheizkraftwerk musste hier die Fütterung auf Teillast verringert werden. Das hatte eine dramatische Verringerung der archaeellen Abundanz um zwei Größenordnungen und gleichermaßen eine über 50 %ige Verringerung der Methanbildungsrate zur Folge (207). Wie bereits diskutiert, schöpfen die Archaea in Anlage A ihre metabolische Kapazität nicht voll aus. Durch weitere Verringerung der Substratzufuhr kam es im April 2014 zu einem Mangel an Nährstoffen, der zur Verringerung der archaeellen Abundanz führte. Im Gegensatz dazu veränderte sich die Zahl der Bacteria kaum. Demnach ist das Nährstoffangebot für die Bacteria trotz der verringerten Substratzufuhr noch ausreichend. Das deutet darauf hin, dass die ersten Schritte der anaeroben Fermentation und nicht die Methanogenese geschwindigkeitsbestimmend in Anlage A sind. Zu diesem Schluss kamen auch andere Studien (17) (18). Es ist jedoch auffällig, dass die oTS nach dem Störfall im April 2014 nur geringfügig stieg und im April 2015 sogar geringer ist, als im April 2014. Dennoch konnte sich die archaeelle Biozönose regenerieren und deren Anzahl auf ihr ursprüngliches Niveau zurückkehren. Demnach zeigt sich auch hier eine gute Anpassungsfähigkeit der Methanogenen an vorherrschende Umweltbedingungen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die archaeelle Gemeinschaft durchaus in der Lage ist, sich an Stressbedingungen anzupassen, ohne dass sich die Biozönose wesentlich verändert. Erst dramatische Veränderungen der physikochemischen Parameter, wie sie im Rahmen des ersten Ammoniumversuches auftraten, führen zu deutlichen Variationen in der archaeellen Population. Diese Schlussfolgerung lässt sich auch anhand der auf den DGGE-Profilen beruhenden Dendrogrammen bestätigen (Abbildung 51). Hier kam es sowohl für das Archaea- als auch *Methanobacteriales*-spezifische Dendrogramm zunächst zur Bildung zweier Cluster, je nach Entnahmezeitpunkt des Ausgangsmaterials. So befanden sich die Proben des jeweils ersten

Hemmversuches, für die das Fermentermaterial im Jahr 2014 entnommen wurde in einem und die des jeweils zweiten Hemmversuches, für die das Fermentermaterial im Jahr 2015 entnommen wurde, in einem zweiten Cluster. Die einzelnen Hemmversuche bildeten erwartungsgemäß einzelne Subcluster, in denen die Proben sehr ähnlich oder sogar identisch waren. Einzige Ausnahme bildet hier der erste Ammoniumhemmversuch, in dem deutliche Veränderungen zu sehen waren und die Probe der schweren Hemmung im *Methanobacteriales*-Dendrogramm sogar außerhalb des Clusters zu finden ist.

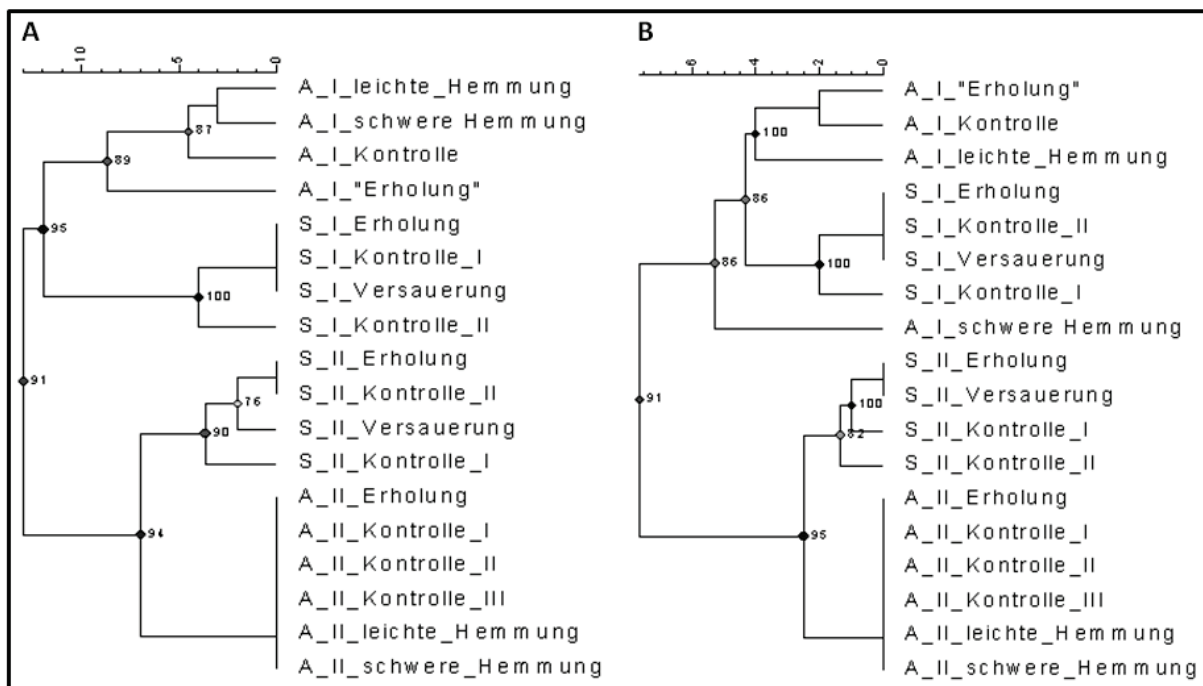


Abbildung 51: Dendrogramm auf Basis der Archaea (A)- und *Methanobacteriales*-(B)- spezifischen DGGE-Profile.

Die Clusteranalysen wurden mit Hilfe der Software *Bionumerics v6.0* basierend auf den spezifischen DGGE-Profilen durchgeführt. Dazu wurde ein Similaritätsindex auf Basis der Anzahl unterschiedlicher Banden berechnet und im Anschluss die Clustering-Methode UPGMA verwendet. Die *bootstrap*-Werte sind an den Abzweigungen angegeben. Der Maßstabsbalken gibt die prozentuale Ähnlichkeit der DGGE-Profile an. A_I: Ammonium-Intoxikation I; A_II: Ammonium-Intoxikation II; S_I: Versauerung I; S_II: Versauerung II.

Eine ähnliche Anpassungsfähigkeit kann auch für die Biozönose aus Anlage KA gefolgt werden. Hier konnten in der archaeellen Biozönose zwischen den Proben aus den Jahren 2013 und 2014 kaum Unterschiede detektiert werden. Dieser Befund ist durchaus überraschend, da es eine Woche vor der Entnahme der ersten Probe aufgrund eines Hochwassers starke Schwankungen in pH-Wert und Temperatur in den Faultürmen F1 und F2 gemessen wurden und die Gasproduktion teilweise zum Erliegen kam (Daten nicht gezeigt). Die konstante archaeelle Biozönose lässt jedoch darauf schließen, dass es aufgrund der sehr kurzfristigen Veränderungen in den Biogasreaktoren lediglich zu einer Veränderung der mikrobiellen Aktivität, nicht aber deren Zusammensetzung kam.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Trotz der zunehmenden Bedeutung, die der Biogasprozess in der Reihe der regenerativen Energiequellen seit einigen Jahren einnimmt, sind dessen mikrobiologische Prozesse häufig nur zum Teil verstanden und die Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose oft unbekannt. Um jedoch die Biogasgewinnung möglichst effektiv zu gestalten, ist es essentiell, die physikochemischen Bedingungen im Reaktor an die Mikroorganismen anzupassen. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, die mikrobielle Gemeinschaft in verschiedenen Biogasanlagen abhängig vom eingesetzten Substrat zu charakterisieren. Dabei zeigte sich, dass insbesondere die archaeelle Diversität in NawaRo-Anlagen sehr limitiert ist und die Organismen in den einzelnen Anlagen nah verwandt sind. Von großer Bedeutung waren dabei die Genera *Methanoculleus* und *Methanosarcina* (bei hoher Acetatkonzentration) bzw. *Methanothrix* (bei geringer Acetatkonzentration). Deren genaues Verhältnis in den verschiedenen Anlagen hing wesentlich von den zugesetzten Co-Substraten ab und vor allem in Anlage A konnte eine Abhängigkeit der Abundanz von *Methanosarcina* je nach Zusatz von Hühnertrockenkot bzw. Rindermist beobachtet werden. Im Gegensatz dazu spielten die untersuchten chemischen Parameter eine geringere Rolle und es konnten kaum Korrelationen zwischen der Abundanz einzelner archaeeller Genera und physikochemischen Parametern beobachtet werden. In der mit Klärschlamm betriebenen Anlage KA waren außerdem verschiedene *Methanobacteriales* und Organismen der WCHA1-57-Klade von Bedeutung.

Neben methanogenen Archaea konnten in den Anlagen C, KA und KL außerdem *Crenarchaeota* nachgewiesen werden, die wahrscheinlich in das erst kürzlich neu postulierte Phylum der „*Bathyarchaeota*“ einzuordnen sind. Deren genaue physiologische Funktion im Biogasprozess ist jedoch noch ungeklärt.

Zusätzlich zu den Archaea wurden exemplarisch auch Proben aus den einzelnen Anlagen hinsichtlich ihrer bakteriellen Population untersucht. Dabei waren in den NawaRo-Anlagen A, B, C und KL vor allem *Firmicutes* und *Cloacimonetes* zu finden. Letztere stellen dabei eine bisher nur wenig charakterisierte Gruppe dar, die wahrscheinlich im hydrolytischen Abbau von Cellulose und/oder Aminosäuren eine entscheidende Rolle spielen. Innerhalb der *Firmicutes* übten insbesondere die *Clostridiales* vielseitige physiologische Funktionen innerhalb der anaeroben Fermentation aus. Überraschend gering war jedoch der Anteil der syntrophen Organismen. Es ist möglich, dass einige der nicht näher klassifizierbaren OTUs dieser Gruppe angehören, da der syntrophe Abbau verschiedener Säuren von essentieller Bedeutung für den Biogasprozess ist. In der mit kommunalem Abwasserschlamm betriebenen Anlage KA war der Anteil der *Firmicutes* und

Cloacimonetes deutlich geringer. Abundantestes Phylum waren hier die *Proteobacteria*, unter denen zusätzlich Syntrophe zu finden sind.

Zusätzlich zur Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaft während des Normalbetriebes von Biogasanlagen wurden außerdem häufige Prozessstörungen simuliert. Dabei zeigte sich, dass es trotz rückläufiger Methanbildung häufig nicht zu Veränderungen in der Zusammensetzung der Mikroorganismen kommt und stattdessen deren Aktivität sinkt. Erst bei dramatischer Veränderung der physikochemischen Parameter, wie es im Rahmen des ersten Versuchs zur Ammonium-Intoxikation der Fall war, wurden deutliche Veränderungen in der archaeellen Biozönose detektiert. Die bakterielle Gemeinschaft blieb dabei kaum verändert. Bei geringerer Ammoniumkonzentration hingegen konnte eine gute Anpassungsfähigkeit der Archaea gezeigt werden. Dennoch war es nicht möglich, anhand dieser Versuche einen allgemein gültigen Grenzwert der Ammoniumkonzentration, ab der inhibitorische Effekte auftreten, festzulegen, da in Anlage A bei ähnlichen Konzentrationen die archaeelle Abundanz durchaus zurückging. Auch im Rahmen der Versuche zur Versauerung konnte eine gute Anpassungsfähigkeit der Archaea gegenüber erhöhten FOS-Konzentrationen gezeigt werden. Dabei war insbesondere eine erhöhte Abundanz der *Syntrophomonadaceae* mit Stressresistenz verbunden, während eine erhöhte Abundanz von *Methanobacterium* mit verminderter Säuretoleranz einher ging.

Insgesamt liefern die Ergebnisse dieser Arbeit einen aufschlussreichen Einblick in die mikrobielle Population in NawaRo-Anlagen sowohl während des Normalbetriebes als auch im Verlauf von Prozessstörungen, die zu einem besseren Verständnis der ablaufenden Prozesse beitragen können. Dennoch ist die Rolle vieler beteiligter Organismen noch nicht gänzlich geklärt. Es sind daher weitere Studien nötig, um die mikrobiologischen Prozesse in Biogasanlagen vollständig zu verstehen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Rasi S., Veijanen A., Rintala J.** Trace compounds of biogas from different biogas production plants. *Energy*. 32 (8), 2007, S. 1375–1380.
2. **Angelidaki I., Karakashev D., Batstone D.J., Plugge C.M., Stams A.J.** Biomethanation and its potential. *Methods Enzymol.* 494, 2011, S. 327-351.
3. **Hattori S.** Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments. *Microbes Environ.* 23 (2), 2008, S. 118-127.
4. **Liu Y., Whitman W.B.** Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann N Y Acad Sci.* 1125, 2008, S. 171-189.
5. **Gerardi M.H.** Anaerobic Digestion Stages. *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. s.l. : John Wiley & Sons Inc., Hoboken, 2003, S. 51-57.
6. **Bauer C., Lebuhn M., Gronauer A.** *Mikrobiologische Prozesse in landwirtschaftlichen Biogasanlagen*. s.l. : Bayrische Landesanstalt für Landwirtschaft, 2009. Bd. 12.
7. **Schnürer A., Jarvis A.** Microbiological handbook for biogas plants. *Swedish Gas Centre Report 207*. 2009.
8. **Azman S., Khadem A.F., Van Lier J.B., Zeeman G., Plugge C.M.** Presence and role of anaerobic hydrolytic microbes in conversion of lignocellulosic biomass for biogas production. *Crit Rev Env Sci Tec.* 2015, Bd. 45 (23), S. 2523-2564.
9. **Nelson M.C., Morrison M., Yu Z.** A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. *Bioresour Technol.* 102 (4), 2011, S. 3730-3739.
10. **Li J., Rui J., Yao M., Zhang S., Yan X., Wang Y., Yan Z., Li X.** Substrate type and free ammonia determine bacterial community structure in full-scale mesophilic anaerobic digesters treating cattle or swine manure. *Front Microbiol.* 6, 2015.
11. **Wagner A.O., Lins P., Malin C., Reitschuler C., Illmer P.** Impact of protein-, lipid- and cellulose-containing complex substrates on biogas production and microbial communities in batch experiments. *Sci Total Environ.* 458-460, 2013, S. 256-266.
12. **Zhang W., Werner J.J., Agler M.T., Angenent L.T.** Substrate type drives variation in reactor microbiomes of anaerobic digesters. *Bioresour Technol.* 151, 2014, S. 397-401.
13. **Lee S.H., Kang H.J., Lee Y.H., Lee T.J., Han K., Choi Y., Park H.D.** Monitoring bacterial community structure and variability in time scale in full-scale anaerobic digesters. *J Environ Monit.* 14 (7), 2012, S. 1893-1905.
14. **Levén L., Eriksson A.R., Schnürer A.** Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste. *FEMS Microbiol Ecol.* 59 (3), 2007, S. 683-693.
15. **Sundberg C., Al-Soud W.A., Larsson M., Alm E., Yekta S.S., Svensson B.H., Sørensen S.J., Karlsson A.** 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS Microbiol Ecol.* 85 (3), 2013, S. 612-626.
16. **Edelmann W.** Biogaserzeugung und -nutzung. [Buchverf.] Kaltschmitt M. und Hartmann H. *Energie aus Biomasse*. s.l. : Springer Verlag, Berlin, 2001, S. 641-692.
17. **Mata-Alvarez J., Macé S., Labrás P.** Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresour Technol.* 74 (1), 2000, S. 3-16.

18. **Noike T., Endo G., Chang J.E., Yaguchi J., Matsumoto J.** Characteristics of carbohydrate degradation and the rate-limiting step in anaerobic digestion. *Biotechnol Bioeng.* 27 (10), 1985, S. 1482-1489.
19. **Ali Shah F., Mahmood Q., Maroof Shah M., Pervez A., Ahmad Asad S.** Microbial ecology of anaerobic digesters: the key players of anaerobiosis. *Scientific World Journal.* 19, 2014.
20. **Harper S.R., Pohland F.G.** Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. *Biotechnol Bioeng.* 28 (4), 1986, S. 585-602.
21. **Schink B.** Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61 (2), 1997, S. 262-280.
22. **Schnürer A., Schink B., Svensson B.H.** *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *Int J Syst Bacteriol.* 46 (4), 1996, S. 1145-1152.
23. **Zinder S.H., Koch M.** Non-acetoclastic methanogenesis from acetate: Acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Arch Microbiol.* 138, 1984, S. 263-273.
24. **Westerholm M., Dolfig J., Sherry A., Gray N.D., Head I.M., Schnürer A.** Quantification of syntrophic acetate-oxidizing microbial communities in biogas processes. *Environ Microbiol Rep.* 3 (4), 2011, S. 500-505.
25. **McInerney M.J., Struchtemeyer C.G., Sieber J., Mouttaki H., Stams A.J., Schink B., Rohlin L., Gunsalus R.P.** Physiology, ecology, phylogeny, and genomics of microorganisms capable of syntrophic metabolism. *Ann N Y Acad Sci.* 1125, 2008, S. 58-72.
26. **Karakashev D., Batstone D.J., Trably E., Angelidaki I.** Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of *Methanosaetaceae*. *Appl Environ Microbiol.* 72 (7), 2006, S. 5138-5141.
27. **Schnürer A., Nordberg A.** Ammonia, a selective agent for methane production by syntrophic acetate oxidation at mesophilic temperature. *Water Sci Technol.* 57 (5), 2008, S. 735-740.
28. **Schnürer A., Zellner G., Svensson B.H.** Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. *FEMS Microbiol Ecol.* 29 (3), 1999, S. 249-261.
29. **Schauer N.L., Ferry J.G.** Properties of formate dehydrogenase in *Methanobacterium formicicum*. *J Bacteriol.* 150 (1), 1982, S. 1-7.
30. **Daniels L., Fuchs G., Thauer R.K., Zeikus J.G.** Carbon monoxide oxidation by methanogenic bacteria. *J Bacteriol.* 132 (1), 1977, S. 118-126.
31. **Widdel F.** Growth of methanogenic bacteria in pure culture with 2-propanol and other alcohols as hydrogen donors. *Appl Environ Microbiol.* 51 (5), 1986, S. 1056-1062.
32. **Lebuhn M., Gronauer A.** Microorganisms in the biogas-process - the unknown beings. *Landtechnik.* 64 (2), 2009, S. 127-130.
33. **Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.** *Bioenergie, die vielfältige erneuerbare Energie.* 2013.
34. **Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit.** *Climate Action in Figures, Facts, Trends and Incentives for German Climate Policy.* 2015.
35. **Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.** *Basisdaten Bioenergie Deutschland.* 2015.
36. **Appels L., Baeyens J., Degreve J., Dewil R.** Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Prog Energy Combust.* 34 (6), 2008, S. 755-781.
37. **Weiland P.** Biogas production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85 (4), 2010, S. 849-860.
38. **de Graaf D., Fendler R.** *SPIN Hintergrundpapier "Biogaserzeugung in Deutschland".* s.l. : Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau, 2010.

39. **Fachverband Biogas e.V.** Branchenzahlen 2014 und Prognose der Branchenentwicklung 2015. [Online] [Zitat vom: 10. 02 2016.] http://www.biogas.org/edcom/webfvb.nsf/id/DE_Branchenzahlen.
40. **Khalid A., Arshad M., Anjum M., Mahmood T., Dawson L.** The anaerobic digestion of solid organic waste. *Waste Manag.* 31 (8), 2011, S. 1737-1744.
41. **Gerardi M.H.** Temperature. *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. s.l. : John Wiley & Sons Inc., Hoboken, 2003.
42. **Gao W.J., Leung K.T., Qin W.S., Liao B.Q.** Effects of temperature and temperature shock on the performance and microbial community structure of a submerged anaerobic membrane bioreactor. *Bioresour Technol.* 102 (19), 2011, S. 8733-8740.
43. **Abdelgadir A., Chen X., Liu J., Xie X., Zhang J., Zhang K., Wang H., Liu N.** Characteristics, process parameters, and inner components of anaerobic bioreactors. *Biomed Res Int.* 2014, 2014.
44. **Kaiser F., Metzner T., Effenberger M., Gronauer A.** *Sicherung der Prozessstabilität in landwirtschaftlichen Biogasanlagen*. s.l. : Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Freising-Weihenstephan, 2008.
45. **Fricke K., Santen H., Wallmann R., Hüttner A., Dichtl N.** Operating problems in anaerobic digestion plants resulting from nitrogen in MSW. *Waste Manag.* 27 (1), 2007, S. 30-43.
46. **Demirel B., Scherer P.** Trace element requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane. *Biomass Bioener.* 35 (3), 2011, S. 992-998.
47. **Hinken L., Urban I., Haun E., Urban I., Weichgrebe D., Rosenwinkel K.H.** The valuation of malnutrition in the mono-digestion of maize silage by anaerobic batch tests. *Water Sci Technol.* 58 (7), 2008, S. 1453-1459.
48. **Munk B., Bauer C., Gronauer A., Lebuhn M.** Population dynamics of methanogens during acidification of biogas fermenters fed with maize silage. *Eng Life Sci.* 10 (6), 2010, S. 496-508.
49. **Munk B., Lebuhn M.** Process diagnosis using methanogenic Archaea in maize-fed, trace element depleted fermenters. *Anaerobe.* 29, 2014, S. 22-28.
50. **Lebuhn M., Liu F., Heuwinkel H., Gronauer A.** Biogas production from mono-digestion of maize silage-long-term process stability and requirements. *Water Sci Technol.* 58 (8), 2008, S. 1645-1651.
51. **Reinhold G.** *Fermentation*. s.l. : Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Jena, 2005.
52. **Demirel B.** Major pathway of methane formation from energy crops in agricultural biogas digesters. *Crit Rev Env Sci Tech.* 44 (3), S. 199-222.
53. **Evrano B., Demirel B.** The impact of Ni, Co and Mo supplementation on methane yield from anaerobic mono-digestion of maize silage. *Environ Technol.* 36 (9-12), 2015, S. 1556-1562.
54. **Lettinga G.** Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 67, 1995, S. 3-28.
55. **Narihiro T., Sekiguchi Y.** Microbial communities in anaerobic digestion processes for waste and wastewater treatment: a microbiological update. *Curr Opin Biotechnol.* 18 (3), 2007, S. 273-278.
56. **Durth A., Kolvenbach F.J.** Abwasser und Klärschlamm in Deutschland- statistische Betrachtungen. *Korrespondenz Abwasser, Abfall.* 61 (12), 2014.
57. **Pohland F.G., Ghosh S.** Developments in anaerobic stabilization of organic wastes - the two-phase concept. *Environ Lett.* 1 (4), 1971, S. 255-266.
58. **Gerardi M.H.** Alkalinity and pH. *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. John Wiley & Sons Inc., Hoboken : s.n., 2003, S. 99-103.
59. **Turovskiy I.S., Mathai P.K.** *Wastewater sludge processing*. s.l. : John Wiley & Sons Inc., Hoboken, 2006.
60. **Mechichi T., Sayadi S.** Evaluating process imbalance of anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *Process Biochem.* 40 (1), 2005, S. 139-145.

61. **Siegert I., Banks C.** The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. *Process Biochem.* 40 (11), 2005, S. 3412-3418.
62. **Weiland P.** Wichtige Messdaten für den Prozessablauf und Stand der Technik in der Praxis. *Messen, Steuern, Regeln bei der Biogaserzeugung*. s.l. : Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., Gülzow, 2007, S. 17-31.
63. **Rieger C., Weiland P.** Prozessstörungen frühzeitig erkennen. *Biogas Journal*. 9 (4), 2006, S. 18-20.
64. **Gerardi M.H.** Toxicity. *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. s.l. : John Wiley & Sons Inc., Hoboken, 2003, S. 105-115.
65. **Chen Y., Cheng J.J., Creamer K.S.** Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresour Technol.* 99 (10), 2008, S. 4044-4064.
66. **Koster I.W., Lettinga G.** Anaerobic digestion at extreme ammonia concentrations. *Biol Wastes*. 25 (1), 1988, S. 51-59.
67. **Parkin G.F., Miller S.W.** Response of methane fermentation to continuous addition of selected industrial toxicants. *Proceedings of the 37th Industrial Waste Conference*. 1983, S. 729-744.
68. **Kurr M., Huber R.K., König, H., Jannasch H.W., Fricke H., Trincone A., Kristjansson J.K., Stetter K.O.** *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C. *Arch Microbiol.* 156 (4), 1991, S. 239-247.
69. **Simankova M.V., Parshina S.N., Tourova T.P., Kolganova T.V., Zehnder A.J., Nozhevnikova A.N.** *Methanosarcina lacustris* sp. nov., a new psychrotolerant methanogenic archaeon from anoxic lake sediments. *Syst Appl Microbiol.* 24 (3), 2001, S. 362-367.
70. **Franzmann P.D., Liu Y., Balkwill D.L., Aldrich H.C., Conway de Macario E., Boone D.R.** *Methanogenium frigidum* sp. nov., a psychrophilic, H₂-using methanogen from Ace Lake, Antarctica. *Int J Syst Bacteriol.* 47 (4), 1997, S. 1068-1072.
71. **von Klein D., Arab H., Völker H., Thomm M.** *Methanosarcina baltica*, sp. nov., a novel methanogen isolated from the Gotland Deep of the Baltic Sea. *Extremophiles*. 6, 2002, S. 103-110.
72. **Takai K., Inoue A., Horikoshi K.** *Methanothermococcus okinawensis* sp. nov., a thermophilic, methane-producing archaeon isolated from a Western Pacific deep-sea hydrothermal vent system. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52 (Pt 4), 2002, S. 1089-1095.
73. **Sorokin D.Y., Abbas B., Merkel A.Y., Rijkstra W.I., Damsté J.S., Sukhacheva M.V., van Loosdrecht M.C.** *Methanosalsum natronophilum* sp. nov., and *Methanocalculus alkaliphilus* sp. nov., haloalkaliphilic methanogens from hypersaline soda lakes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 65 (10), 2015, S. 3739-3745.
74. **Francoleon D.R., Boontheung P., Yang Y., Kin U., Ytterberg A.J., Denny P.A., Denny P.C., Loo J.A., Gunsalus R.P., Loo R.R.** S-layer, surface-accessible, and concanavalin A binding proteins of *Methanosarcina acetivorans* and *Methanosarcina mazei*. *J Proteome Res.* 8 (4), 2009, S. 1972-1982.
75. **Wildgruber G., Thomm M., König H., Ober K., Ricchiuto T., Stetter K.O.** *Methanoplanus limicola*, a plate-shaped methanogen representing a novel family, the *Methanoplanaceae*. *Arch Microbiol.* 132, 1982, S. 31-36.
76. **Kendall M.M., Boone D.R.** The order *Methanosarcinales*. [Buchverf.] Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. Stackebrandt E. *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria*, Vol. 3. s.l. : Springer, New York, 2006, S. 244-256.
77. **Stetter K.O., Thomm M., Winter J., Wildgruber G., Huber H., Zillig W., Jane-Covic D., König H., Palm P., Wunderl S.** *Methanothermus fervidus* sp. nov., a novel extremely thermophilic methanogen isolated from an Icelandic hot spring. *Zentralbl Mikrobiol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 1 Orig. C2*, 1981, S. 166-178.

78. Dianou D., Miyaki T., Asakawa S., Morii H., Nagaoka K., Oyaizu H., Matsumoto S. *Methanoculleus chikugoensis* sp. nov., a novel methanogenic archaeon isolated from paddy field soil in Japan, and DNA-DNA hybridization among *Methanoculleus* species. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51 (Pt 5), 2001, S. 1663-1669.
79. Maestrojuan G.M., Boone D.R., Xun L.Y., Mah R.A., Zhang L. Transfer of *Methanogenium bourgense*, *Methanogenium marisnigri*, *Methanogenium olentangyi*, and *Methanogenium thermophilicum* to the genus *Methanoculleus* gen. nov., emendation of *Methanoculleus marisnigri* and *Methanogenium*, and description of new strains of *Methanoculleus bourgense* and *Methanoculleus marisnigri*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 40, 1990, S. 117-122.
80. Deppenmeier U. The unique biochemistry of methanogenesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 71, 2002, S. 223-283.
81. Cheng L., Qiu T.L., Yin X.B., Wu X.L., Hu G.Q., Deng Y., Zhang H. *Methermicoccus shengliensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, methylotrophic methanogen isolated from oil-production water, and proposal of *Methermicoccaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57 (Pt 12), 2007, S. 2964-2969.
82. Thauer R.K., Kaster A.K., Seedorf H., Buckel W., Hedderich R. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat Rev Microbiol.* 6 (8), 2008, S. 579-591.
83. Garcia J.L., Ollivier B., Whitman W.B. The order *Methanomicrobiales*. [Buchverf.] Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. Stackebrandt E. *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria, Vol. 3.* s.l. : Springer, New York, 2006, S. 208-230.
84. Bonin A.S., Boone D.R. The order *Methanobacteriales*. [Buchverf.] Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. Stackebrandt E. *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria, Vol. 3.* s.l. : Springer, New York, 2006, S. 231-243.
85. Whitman W.B., Jeanthon C. *Methanococcales*. [Buchverf.] Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. Stackebrandt E. *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria, Vol. 3.* s.l. : Springer, New York, 2006, S. 257-273.
86. Huber H., Stetter K.O. Order I. *Methanopyrales* ord. nov. [Buchverf.] Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1.* s.l. : Springer, New York, 2001, S. 353-355.
87. Liu Y. *Methanopyrales*. [Buchverf.] Timmis K.N., McGenity T., van der Meer J.R. de Lorenzo V. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.* s.l. : Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2010, S. 605-607.
88. Sakai S., Imachi H., Hanada S., Ohashi A., Harada H., Kamagata Y. *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I', and proposal of the new archaeal order *Methanocellales* ord. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58 (Pt 4), 2008, S. 929-936.
89. Guo J., Peng Y., Ni B.J., Han X., Fan L., Yuan Z. Dissecting microbial community structure and methane-producing pathways of a full-scale anaerobic reactor digesting activated sludge from wastewater treatment by metagenomic sequencing. *Microb Cell Fact.* 14, 2015, S. 33-43.
90. Qiao J.T., Qiu Y.L., Yuan X.Z., Shi X.S., Xu X.H., Guo R.B. Molecular characterization of bacterial and archaeal communities in a full-scale anaerobic reactor treating corn straw. *Bioresour Technol.* 143, 2013, S. 512-518.
91. St-Pierre B., Wright A.D. Metagenomic analysis of methanogen populations in three full-scale mesophilic anaerobic manure digesters operated on dairy farms in Vermont, USA. *Bioresour Technol.* 138, 2013, S. 277-284.

92. **Da Silva M.L., Cantão M.E., Mezzari M.P., Ma J., Nossa C.W.** Assessment of bacterial and archaeal community structure in Swine wastewater treatment processes. *Microb Ecol.* 70 (1), 2015, S. 77-87.
93. **Leclerc M., Delgènes J.P., Godon J.J.** Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. *Environ Microbiol.* 6 (8), 2004, S. 809-819.
94. **Hugenholtz P.** Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biol.* 3 (2), 2002, S. REVIEWS0003.
95. **Hill G.T., Mitkowski N.A., Aldrich-Wolfe L., Emele L.R., Jurkonie D.D., Ficke A., Maldonado-Ramirez S., Lynch S.T., Nelson E.B.** Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Appl Soil Ecol.* 15, 2000, S. 25-36.
96. **Rastogi G. und Sani R.K.** . Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function, and Dynamics in the Environment. [Buchverf.] Ahmad F., Pichtel J. Ahmad I. *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications.* s.l. : Springer Science+Media LLC, New York, 2011, S. 29-57.
97. **Jang H.M., Cho H.U., Park S.K., Ha J.H., Park J.M.** Influence of thermophilic aerobic digestion as a sludge pre-treatment and solids retention time of mesophilic anaerobic digestion on the methane production, sludge digestion and microbial communities in a sequential digestion process. *Water Res.* 48, 2014, S. 1-14.
98. **Kim J., Kim W., Lee C.** Absolute dominance of hydrogenotrophic methanogens in full-scale anaerobic sewage sludge digesters. *J Environ Sci (China).* 25 (11), 2013, S. 2272-2280.
99. **Lv W., Zhang W., Yu Z.** Evaluation of system performances and microbial communities of two temperature-phased anaerobic digestion systems treating dairy manure. *Bioresour Technol.* 143, 2013, S. 431-438.
100. **Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L.** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87 (12), 1990, S. 4576-4579.
101. **Woese C.R.** Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 51 (2), 1987, S. 221-271.
102. **Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G.** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 59 (3), 1993, S. 695-700.
103. **Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R.** Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y).* 11(9), 1993, S. 1026-1030.
104. **Kepner R.L. Jr., Pratt J.R.** Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiol Rev.* 58 (4), 1994, S. 603-615.
105. **Gugliandolo C., Michaud L., Lo Giudice A., Lentini V., Rochera C., Camacho A., Maugeri T.L.** Prokaryotic community in lacustrine sediments of Byers Peninsula (Livingston Island, Maritime Antarctica). *Microb Ecol.* 71 (2), 2016, S. 387-400.
106. **Noguerola I., Picazo A., Llíros M., Camacho A., Borrego C.M.** Diversity of freshwater *Epsilonproteobacteria* and dark inorganic carbon fixation in the sulphidic redoxcline of a meromictic karstic lake. *FEMS Microbiol Ecol.* 91 (7), 2015.
107. **Reyes M., Borrás L., Seco A., Ferrer J.** Identification and quantification of microbial populations in activated sludge and anaerobic digestion processes. *Environ Technol.* 36 (1-4), 2015, S. 45-53.
108. **Zhou L., Wang W., Huang J., Ding Y., Pan Z., Zhao Y., Zhang R., Hu B., Zeng X.** In vitro extraction and fermentation of polyphenols from grape seeds (*Vitis vinifera*) by human intestinal microbiota. *Food Funct.* 7 (4), 2016, S. 1959-1967.

109. **Amann R., Fuchs B.M., Behrens S.** The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation. *Curr Opin Biotechnol.* 12 (3), 2001, S. 231-236.
110. **Amann R., Fuchs B.M.** Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Nat Rev Microbiol.* 6 (5), 2008, S. 339-348.
111. **Roller C., Wagner M., Amann R., Ludwig W., Schleifer K.H.** *In situ* probing of gram-positive bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology.* 140 (Pt 10), 1994, S. 2849-2858.
112. **Schönhuber W., Fuchs B., Juretschko S., Amann R.** Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl Environ Microbiol.* 63 (8), 1997, S. 3268-3273.
113. **Kubota K., Imachi H., Kawakami S., Nakamura K., Harada H., Ohashi A.** Evaluation of enzymatic cell treatments for application of CARD-FISH to methanogens. *J Microbiol Methods.* 72 (1), 2008, S. 54-59.
114. **Pernthaler A., Pernthaler J., Amann R.** Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 68 (6), 2002, S. 3094-3101.
115. **Pernthaler A., Pernthaler J., Amann R.** Sensitive multicolor fluorescence *in situ* hybridization for the identification of environmental microorganisms. [Buchverf.] de Bruijn F.J., Head I.M., Akkermans A.D.L., van Elsas J.D. Kowalchuk G. *Molecular Microbial Ecology Manual.* s.l.: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2004, S. 711-726.
116. **Sekar R., Pernthaler A., Pernthaler J., Warnecke F., Posch T., Amann R.** An improved protocol for quantification of freshwater *Actinobacteria* by fluorescence *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol.* 69 (5), 2003, S. 2928-2935.
117. **Schönhuber W., Zarda B., Eix S., Rippka R., Herdman M., Ludwig W., Amann R.** *In situ* identification of cyanobacteria with horseradish peroxidase-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol.* 65 (3), 1999, S. 1259-1267.
118. **Teira E., Reinthaler T., Pernthaler A., Pernthaler J., Herndl G.J.** Combining catalyzed reporter deposition-fluorescence *in situ* hybridization and microautoradiography to detect substrate utilization by Bacteria and Archaea in the deep ocean. *Appl Environ Microbiol.* 70 (7), 2004, S. 4411-4414.
119. **Molari M., Manini E.** Reliability of CARD-FISH procedure for enumeration of Archaea in deep-sea surficial sediments. *Curr Microbiol.* 64 (3), 2012, S. 242-250.
120. **Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten.** *Das VDLUFA-Methodenhandbuch Band II.1 Die Untersuchung von Düngemitteln.* s.l.: VDLUFA, 1995.
121. **Jurgens G., Lindström K., Saano A.** Novel group within the kingdom *Crenarchaeota* from boreal forest soil. *Appl Environ Microbiol.* 63 (2), 1997, S. 803-805.
122. **Takai K., Horikoshi K.** Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. *Appl Environ Microbiol.* 66 (11), 2000, S. 5066-5072.
123. **Yu Y., Lee C., Hwang S.** Analysis of community structures in anaerobic processes using a quantitative real-time PCR method. *Water Sci Technol.* 52 (1-2), 2005, S. 85-91.
124. **Nicol G.W., Glover L.A., Prosser J.I.** The impact of grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. *Environ Microbiol.* 5 (3), 2003, S. 152-162.
125. **Grosskopf R., Janssen P.H., Liesack W.** Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl Environ Microbiol.* 64 (3), 1998, S. 960-969.

126. **Stahl D. A., Amann R.** Development and application of nucleic acid probes. [Buchverf.] Stackebrandt E. Goodfellow M. *Nucleic acid techniques in bacterial systematic*. s.l. : John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 1991, S. 205-248.
127. **Øvreås L., Forney L., Daae F.L., Torsvik V.** Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 63 (9), 1997, S. 3367-3373.
128. **Lerman L.S., Fischer S.G., Hurley I., Silverstein K., Lumelsky N.** Sequence-determined DNA separations. *Annu Rev Biophys Bioeng.* 13, 1984, S. 399-423.
129. **Sheffield V.C., Cox D.R., Lerman L.S., Myers R.M.** Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86 (1), 1989, S. 232-236.
130. **Vissers E.W., Bodelier P.L., Muyzer G., Laanbroek H.J.** A nested PCR approach for improved recovery of archaeal 16S rRNA gene fragments from freshwater samples. *FEMS Microbiol Lett.* 298 (2), 2009, S. 193-198.
131. **Ornstein L.** Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci.* 121, 1964, S. 321-349.
132. **Sokal R.R., Michener C.D.** A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin.* 38, 1958, S. 1409-1438.
133. **Hall, T.A.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. *Nucl Acids Symp Ser* 41. 1999, S. 95-98.
134. **Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R.** Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 73 (16), 2007, S. 5261-5267.
135. **Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J.** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215, 1990, S. 403-410.
136. **Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24 (8), 2007, S. 1596-1599.
137. **Felsenstein J.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39 (4), 1985, S. 783-791.
138. **Jukes T.H., Cantor C.R.** Evolution of protein molecules. [Buchverf.] Munro H.N. *Mammalian Protein Metabolism, III*. s.l. : Academic Press, New York, 1969, S. 21-132.
139. **Ishii K., Fukui M.** Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol.* 67 (8), 2001, S. 3753-3755.
140. **Franke-Whittle I.H., Goberna M., Insam H.** Design and testing of real-time PCR primers for the quantification of *Methanoculleus*, *Methanosarcina*, *Methanothermobacter*, and a group of uncultured methanogens. *Can J Microbiol.* 55 (5), 2009, S. 611-616.
141. **Shigematsu T., Tang Y., Kawaguchi H., Ninomiya K., Kijima J., Kobayashi T., Morimura S., Kida K.** Effect of dilution rate on structure of a mesophilic acetate-degrading methanogenic community during continuous cultivation. *J Biosci Bioeng.* 96 (6), 2003, S. 547-558.
142. **Muhs E.** *Molecular biological analysis of microbial community in sediments of the drinking water in reservoir*. Technische Universität Dresden : Institut für Angewandte Mikrobiologie, 2011.
143. **Müller J.** *Molekularbiologische Analyse der Biozönose von Bioschlämmen aus Methanreaktoren einer zweistufigen Biogasanlage*. Technische Universität Dresden : Institut für Angewandte Mikrobiologie, 2011.
144. **Klappenbach J.A., Saxman P.R., Cole J.R., Schmidt T.M.** rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Res.* 29 (1), 2001, S. 181-184.

145. **Lee Z.M., Bussema C. 3rd, Schmidt T.M.** rrnDB: documenting the number of rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Res.* 37 (Database issue), S. D489-493.
146. **Porat I., Vishnivetskaya T.A., Mosher J.J., Brandt C.C., Yang Z.K., Brooks S.C., Liang L., Drake M.M., Podar M., Brown S.D., Palumbo A.V.** Characterization of archaeal community in contaminated and uncontaminated surface stream sediments. *Microb Ecol.* 60 (4), 2010, S. 784-795.
147. **Reysenbach A.L., Pace N.R.** Reliable amplification of hyperthermophilic Archaeal 16S rRNA genes by the polymerase chain reaction. [Buchverf.] Place A.R. Robb F.T. *Archaea: Thermophiles: A laboratory manual.* s.l. : Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1995, S. 101-105.
148. **DasSarma S., Fleischmann E.F.** *Archaea: A Laboratory Manual – Halophiles.* s.l. : Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1995. S. 269–272.
149. **Schloss P.D., Gevers D., Westcott S.L.** Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PLoS One.* 6 (12), 2011, S. e27310.
150. **Yue J.C., Clayton M.K.** A similarity measure based on species proportions. *Commun Stat Theo Methods.* 34, 2005, S. 2123–2131.
151. **Simpson E.H.** Measurement of diversity. *Nature.* 163, 1949, S. 688.
152. **Chao A.** Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Stat.* 11 (4), 1984, S. 265-270.
153. **Chao A., Lee S.M.** Estimating the Number of Classes via Sample Coverage. *J Am Stat Assoc.* 87, 1992, S. 210-217.
154. **Sanders H.L.** Marine Benthic Diversity: A Comparative Study. *The American Naturalist.* 102 (925), 1068, S. 243-282.
155. **Röske K., Röske I., Uhlmann D.** Characterization of the bacterial population and chemistry in the bottom sediment of a laterally subdivided drinking water reservoir system. *Limnologica.* 38, 2008, S. 367–377.
156. **Amann R.I., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R., Stahl D.A.** Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol.* 56 (6), 1990, S. 1919-1925.
157. **Daims H., Brühl A., Amann R., Schleifer K.H., Wagner M.** The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol.* 22 (3), 1999, S. 434-444.
158. **Raskin L., Stromley J.M., Rittmann B.E., Stahl D.A.** Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl Environ Microbiol.* 60 (4), 1994, S. 1232-1240.
159. **Balch W.E., Wolfe R.S.** New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminantium* in a pressureized atmosphere. *Appl Environ Microbiol.* 32 (6), 1976, S. 781-791.
160. **Tischer K., Zeder M., Klug R., Pernthaler J., Schattenhofer M., Harms H., Wendeberg A.** Fluorescence *in situ* hybridization (CARD-FISH) of microorganisms in hydrocarbon contaminated aquifer sediment samples. *Syst Appl Microbiol.* 35 (8), 2012, S. 526-532.
161. **Davenport R.J., Curtis T.P., Goodfellow M., Stainsby F.M., Bingley M.** Quantitative use of fluorescent *in situ* hybridization to examine relationships between mycolic acid-containing actinomycetes and foaming in activated sludge plants. *Appl Environ Microbiol.* 66 (3), 2000, S. 1158-1166.
162. **Molobela I.P., Cloete T. E., Beukes M.** Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *Afr J Microbiol Res.* 4 (14), 2010, S. 1515-1524.

163. **Shapiro S.S., Wilk M.B.** An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*. 52 (3/4), 1965, S. 591-611.
164. **Bialek K., Kim J., Lee C., Collins G., Mahony T., O'Flaherty V.** Quantitative and qualitative analyses of methanogenic community development in high-rate anaerobic bioreactors. *Water Res.* 45 (3), 2011, S. 1298-1308.
165. **Yu D., Kurola J.M., Lähde K., Kymäläinen M., Sinkkonen A., Romantschuk M.** Biogas production and methanogenic archaeal community in mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion processes. *J Environ Manage.* 143, 2014, S. 54-60.
166. **Yu Z., García-González R., Schanbacher F.L., Morrison M.** Evaluations of different hypervariable regions of archaeal 16S rRNA genes in profiling of methanogens by Archaea-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 74 (3), 2008, S. 889-893.
167. **Ban Q., Li J., Zhang L., Jha A.K., Zhang Y., Ai B.** Syntrophic propionate degradation response to temperature decrease and microbial community shift in an UASB reactor. *J Microbiol Biotechnol.* 23 (3), 2013, S. 382-389.
168. **Pereira J.O., Mac Conell E.F., Silva S.Q., Chernicharo C.A.** Granular biomass selection in a double-stage biogas collection UASB reactor: effects on SMA, abundance and diversity of the methanogenic population. *Water Sci Technol.* 66 (12), 2012, S. 2570-2577.
169. **Regueiro L., Veiga P., Figueroa M., Alonso-Gutierrez J., Stams A.J., Lema J.M., Carballa M.** Relationship between microbial activity and microbial community structure in six full-scale anaerobic digesters. *Microbiol Res.* 167 (10), 2012, S. 581-589.
170. **Zielińska M., Cydzik-Kwiatkowska A., Zieliński M., Dębowski M.** Impact of temperature, microwave radiation and organic loading rate on methanogenic community and biogas production during fermentation of dairy wastewater. *Bioresour Technol.* 129, 2013, S. 308-314.
171. **Jang H.M., Park S.K., Ha J.H., Park J.M.** Microbial community structure in a thermophilic aerobic digester used as a sludge pretreatment process for the mesophilic anaerobic digestion and the enhancement of methane production. *Bioresour Technol.* 145, 2013, S. 80-89.
172. **Merlino G., Rizzi A., Schievano A., Tenca A., Scaglia B., Oberti R., Adani F., Daffonchio D.** Microbial community structure and dynamics in two-stage vs single-stage thermophilic anaerobic digestion of mixed swine slurry and market bio-waste. *Water Res.* 47 (6), 2013, S. 1983-1995.
173. **Neilson J.W., Jordan F.L., Maier R.M.** Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis. *J Microbiol Methods.* 92 (3), 2013, S. 256-263.
174. **Johansen C., Falholt P., Gram L.** Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 63 (9), 1997, S. 3724-3728.
175. **Montero B., Garcia-Morales J.L., Sales D., Solera R.** Evolution of microorganisms in thermophilic-dry anaerobic digestion. *Bioresour Technol.* 99 (8), 2008, S. 3233-3243.
176. **Zahedi S., Sales D., Romero L.I., Solera R.** Dark fermentation from real solid waste. Evolution of microbial community. *Bioresour Technol.* 151, 2014, S. 221-226.
177. **Gast R.J., Dennett M.R., Caron D.A.** Characterization of protistan assemblages in the Ross Sea, Antarctica, by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 70 (4), 2004, S. 2028-2037.
178. **Sierra M.M.D., Giovanela M., Parlanti E., Soriano-Sierra E.J.** Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere.* 58 (6), 2005, S. 715-733.
179. **Tebbe C.C., Vahjen W.** Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl Environ Microbiol.* 59 (8), 1993, S. 2657-2665.

180. **Schriewer A., Wehlmann A., Wuertz S.** Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8. *J Microbiol Methods*. 85 (1), 2011, S. 16-21.
181. **Mahmoudi N., Slater G.F., Fulthorpe R.R.** Comparison of commercial DNA extraction kits for isolation and purification of bacterial and eukaryotic DNA from PAH-contaminated soils. *Can J Microbiol*. 57 (8), 2011, S. 623-628.
182. **Fitzpatrick K.A., Kersh G.J., Massung R.F.** Practical method for extraction of PCR-quality DNA from environmental soil samples. *Appl Environ Microbiol*. 76 (13), 2010, S. 4571-4573.
183. **von Wintzingerode F., Göbel U.B., Stackebrandt E.** Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev*. 21 (3), 1997, S. 213-229.
184. **Mirmohammadsadeghi H., Abedi D., Mohmoudpour H.R., Akbari V.** Comparison of five methods for extraction of genomic DNA from a marine Archaea, *Pyrococcus furiosus*. *Pak J Med Sci*. 29 (1), 2013, S. 390-394.
185. **Picard C., Ponsonnet C., Paget E., Nesme X., Simonet P.** Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*. 58 (9), 1992, S. 2717-2722.
186. **Salonen A., Nikkilä J., Jalanka-Tuovinen J., Immonen O., Rajilić-Stojanović M., Kekkonen R.A., Palva A., de Vos W. M.** Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: Effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *J Microbiol Meth*. 81 (2), 2010, S. 127-134.
187. **Yu Z., Morrison M.** Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques*. 36 (5), 2004, S. 808-812.
188. **Zhou J., Bruns M. A., Tiedje T. M.** DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol*. 62 (2), 1996, S. 316-322 .
189. **Knauth S., Schmidt H., Tippkötter R.** Comparison of commercial kits for the extraction of DNA from paddy soils. *Lett Appl Microbiol*. 56 (3), 2013, S. 222-228.
190. **Hong S., Bunge J., Leslin C., Jeon S., Epstein S.S.** Polymerase chain reaction primers miss half of rRNA microbial diversity. *ISME J*. 3 (12), 2009, S. 1365-1373.
191. **Crosby L.D., Criddle C.S.** Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrn operon copy number heterogeneity. *Biotechniques*. 34 (4), 2003, S. 790-794.
192. **Nübel U., Engelen B., Felske A., Snajdr J., Wieshuber A., Amann R.I., Ludwig W., Backhaus H.** Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol*. 178 (19), 1996, S. 5636-5643.
193. **Hong H., Pruden A., Reardon K.F.** Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. *J Microbiol Methods*. 69 (1), 2007, S. 52-64.
194. **Kowalchuk G.A., Stephen J.R., De Boer W., Prosser J.I., Embley T.M., Woldendorp J.W.** Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl Environ Microbiol*. 63 (4), 1997, S. 1489-1497.
195. **Sekiguchi H., Tomioka N., Nakahara T., Uchiyama H.** A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnol Lett*. 23, 2001, S. 1205-1208.
196. **Ercolini D., Hill P.J., Dodd C.E.** Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Appl Environ Microbiol*. 69 (6), 2003, S. 3540-3548.

197. **Gelsomino A., Keijzer-Wolters A.C., Cacco G., van Elsas J.D.** Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods*. 38 (1-2), 1999, S. 1-15.
198. **Gittel A., Mussmann M., Sass H., Cypionka H., Könneke M.** Identity and abundance of active sulfate-reducing bacteria in deep tidal flat sediments determined by directed cultivation and CARD-FISH analysis. *Environ Microbiol*. 10 (10), 2008, S. 2645-2658.
199. **Kubo K., Knittel K., Amann R., Fukui M., Matsuura K.** Sulfur-metabolizing bacterial populations in microbial mats of the Nakabusa hot spring, Japan. *Syst Appl Microbiol*. 34 (4), 2011, S. 293-302.
200. **Li H., Yang Q., Li J., Gao H., Li P., Zhou H.** The impact of temperature on microbial diversity and AOA activity in the Tengchong Geothermal Field, China. *Sci Rep*. 5, 2015, S. 17056.
201. **Tujula N.A., Crocetti G.R., Burke C., Thomas T., Holmström C., Kjelleberg S.** Variability and abundance of the epiphytic bacterial community associated with a green marine Ulvacean alga. *ISME J*. 4 (2), 2010, S. 301-311.
202. **Fazi S., Aulenta F., Majone M., Rossetti S.** Improved quantification of *Dehalococcoides* species by fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition. *Syst Appl Microbiol*. 31 (1), 2008, S. 62-67.
203. **Lloyd K.G., May M.K., Kevorkian R.T., Steen A.D.** Meta-analysis of quantification methods shows that Archaea and Bacteria have similar abundances in the subseafloor. *Appl Environ Microbiol*. 79 (24), 2013, S. 7790-7799.
204. **Wilhartitz I., Mach R.L., Teira E., Reinthaler T., Herndl G.J., Farnleitner A.H.** Prokaryotic community analysis with CARD-FISH in comparison with FISH in ultra-oligotrophic ground- and drinking water. *J Appl Microbiol*. 103 (4), 2007, S. 871-881.
205. **Olwoch I.P., Greeff O.B., Jooné G., Steenkamp V.** The effects of the natural enzyme, Pectinex Ultra SP-L, on human cell cultures and bacterial biofilms *in vitro*. *BMC Microbiol*. 14, 2014, S. 251.
206. **Cardinali-Rezende J., Colturato L.F., Colturato T.D., Chartone-Souza E., Nascimento A.M., Sanz J.L.** Prokaryotic diversity and dynamics in a full-scale municipal solid waste anaerobic reactor from start-up to steady-state conditions. *Bioresour Technol*. 119, 2012, S. 373-383.
207. **Kern T., Theiss J., Röske K., Rother M.** Assessment of hydrogen metabolism in commercial anaerobic digesters. *Appl Microbiol Biotechnol*. 100 (10), 2016, S. 4699-4710.
208. **MacDonald R., Brözel V.S.** Community analysis of bacterial biofilms in a simulated recirculating cooling-water system by fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Wat Res*. 34 (9), 2000, S. 2439-2446.
209. **Kröber M., Bekel T., Diaz N.N., Goesmann A., Jaenicke S., Krause L., Miller D., Runte K.J., Viehöver P., Pühler A., Schlüter A.** Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. *J Biotechnol*. 142 (1), 2009, S. 38-49.
210. **Stolze Y., Zakrzewski M., Maus I., Eikmeyer F., Jaenicke S., Rottmann N., Siebner C., Pühler A., Schlüter A.** Comparative metagenomics of biogas-producing microbial communities from production-scale biogas plants operating under wet or dry fermentation conditions. *Biotechnol Biofuels*. 8, 2015, S. 14-31.
211. **Souidi K., Mumme J., Nettmann E., Bergmann I., Linke B., Klocke M.** Microbial diversity in a biogas-producing co-fermentation of maize silage and bovine manure. *Agricultural Engineering Research*. 13 (6), 2007, S. 197-206.
212. **Theuerl S., Kohrs F., Benndorf D., Maus I., Wibberg D., Schlüter A., Kausmann R., Heiermann M., Rapp E., Reichl U., Pühler A., Klocke M.** Community shifts in a well-operating agricultural biogas

- plant: how process variations are handled by the microbiome. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99 (18), 2015, S. 7791-7803.
213. **Ziganshin A.M., Liebetrau J., Pröter J., Kleinsteuber S.** Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97 (11), 2013, S. 5161-5174.
214. **Lv Z., Leite A.F., Harms H., Richnow H.H., Liebetrau J., Nikolausz M.** Influences of the substrate feeding regime on methanogenic activity in biogas reactors approached by molecular and stable isotope methods. *Anaerobe.* 29, 2014, S. 91-99.
215. **Jensen B.B.** Methanogenesis in monogastric animals. *Environ Monit Assess.* 42 (1-2), 1996, S. 99-112.
216. **St-Pierre B., Wright A.D.** Diversity of gut methanogens in herbivorous animals. *Animal.* Suppl 1, 2013, S. 49-56.
217. **De Francisci D., Kougias P.G., Treu L., Campanaro S., Angelidaki I.** Microbial diversity and dynamicity of biogas reactors due to radical changes of feedstock composition. *Bioresour Technol.* 176, 2015, S. 56-64.
218. **Belostotskiy D.E., Ziganshina E.E., Siniagina M., Boulygina E.A., Miluykov V.A., Ziganshin A.M.** Impact of the substrate loading regime and phosphoric acid supplementation on performance of biogas reactors and microbial community dynamics during anaerobic digestion of chicken wastes. *Bioresour Technol.* 193, 2015, S. 42-52.
219. **Leite A.F., Janke L., Lv Z., Harms H., Richnow H.H., Nikolausz M.** Improved monitoring of semi-continuous anaerobic digestion of sugarcane waste: Effects of increasing organic loading rate on methanogenic community dynamics. *Int J Mol Sci.* 16 (10), 2015, S. 23210-23226.
220. **Kampmann K., Ratering S., Geißler-Plaum R., Schmidt M., Zerr W., Schnell S.** Changes of the microbial population structure in an overloaded fed-batch biogas reactor digesting maize silage. *Bioresour Technol.* 174, 2014, S. 108-117.
221. **Razaviarani V., Buchanan I.** Anaerobic co-digestion of biodiesel waste glycerin with municipal wastewater sludge: microbial community structure dynamics and reactor performance. *Bioresour Technol.* 182, 2015, S. 8-17.
222. **Sträuber H., Lucas R., Kleinsteuber S.** Metabolic and microbial community dynamics during the anaerobic digestion of maize silage in a two-phase process. *Appl Microbiol Biotechnol.* 100 (1), 2016, S. 479-491.
223. **Karakashev D., Batstone D.J., Angelidaki I.** Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Appl Environ Microbiol.* 71 (1), 2005, S. 331-338.
224. **Griffin M.E., McMahon K.D., Mackie R.I., Raskin L.** Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids. *Biotechnol Bioeng.* 57 (3), 1998, S. 342-355.
225. **Nikolausz M., Walter R.F., Sträuber H., Liebetrau J., Schmidt T., Kleinsteuber S., Bratfisch F., Günther U., Richnow H.H.** Evaluation of stable isotope fingerprinting techniques for the assessment of the predominant methanogenic pathways in anaerobic digesters. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97 (5), 2013, S. 2251-2262.
226. **Smith K.S., Ingram-Smith C.** *Methanosaeta*, the forgotten methanogen? *Trends Microbiol.* 15 (4), 2007, S. 150-155.
227. **Jetten M.S.M., Stams A.J.M., Zehnder A.J.B.** Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotherix soehngenii* and *Methanosarcina* spp. *FEMS Microbiol Lett.* 88 (3-4), 1992, S. 181-198.

228. **Asakawa S., Nagaoka K.** *Methanoculleus bourgensis*, *Methanoculleus olentangyi* and *Methanoculleus oldenburgensis* are subjective synonyms. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53 (Pt 5), 2003, S. 1551-1552.
229. **Maus I., Wibberg D., Stantscheff R., Eikmeyer F.G., Seffner A., Boelter J., Szczepanowski R., Blom J., Jaenicke S., König H., Pühler A., Schlüter A.** Complete genome sequence of the hydrogenotrophic, methanogenic archaeon *Methanoculleus bourgensis* strain MS2(T), isolated from a sewage sludge digester. *J Bacteriol.* 194 (19), 2012, S. 5487-5488.
230. **Ike M., Inoue D., Miyano T., Liu T.T., Sei K., Soda S., Kadoshin S.** Microbial population dynamics during startup of a full-scale anaerobic digester treating industrial food waste in Kyoto eco-energy project. *Bioresour Technol.* 101 (11), 2010, S. 3952-3957.
231. **Sawayama S., Tsukahara K., Yagishita T.** Phylogenetic description of immobilized methanogenic community using real-time PCR in a fixed-bed anaerobic digester. *Bioresour Technol.* 97 (1), 2006, S. 69-76.
232. **Battumur U., Yoon Y.M., Kim C.H.** Isolation and Characterization of a New *Methanobacterium formicicum* KOR-1 from an Anaerobic Digester Using Pig Slurry. *Asian-Australas J Anim Sci.* 29 (4), 2016, S. 586-593.
233. **Cuzin N., Ouattara A.S., Labat M., Garcia J.L.** *Methanobacterium congolense* sp. nov., from a methanogenic fermentation of cassava peel. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51 (Pt 2), 2001, S. 489-493.
234. **Kern T., Linge M., Rother M.** *Methanobacterium aggregans* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogenic archaeon isolated from an anaerobic digester. *Int J Syst Evol Microbiol.* 65 (Pt 6), 2015, S. 1975-1980.
235. **Ma K., Liu X., Dong X.** *Methanobacterium beijingense* sp. nov., a novel methanogen isolated from anaerobic digesters. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55 (Pt 1), 2005, S. 325-329.
236. **Sekiguchi Y., Kamagata Y., Nakamura K., Ohashi A., Harada H.** *Syntrophothermus lipocalidus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, syntrophic, fatty-acid-oxidizing anaerobe which utilizes isobutyrate. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50, 2000, S. 771-779.
237. **Stams A.J., Grolle K.C., Frijters C.T., Van Lier J.B.** Enrichment of thermophilic propionate-oxidizing bacteria in syntrophy with *Methanobacterium thermoautotrophicum* or *Methanobacterium thermoformicum*. *Appl Environ Microbiol.* 58 (1), 1992, S. 346-352.
238. **Van Lier J.B., Grolle K.C., Frijters C.T., Stams A.J., Lettinga G.** Effects of acetate, propionate, and butyrate on the thermophilic anaerobic degradation of propionate by methanogenic sludge and defined cultures. *Appl Environ Microbiol.* 59 (4), 1993, S. 1003-1011.
239. **Sousa D.Z., Smidt H., Alves M.M., Stams A.J.** *Syntrophomonas zehnderi* sp. nov., an anaerobe that degrades long-chain fatty acids in co-culture with *Methanobacterium formicicum*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57 (Pt 3), 2007, S. 609-615.
240. **Wu C., Dong X., Liu X.** *Syntrophomonas wolfei* subsp. *methylbutyratica* subsp. nov., and assignment of *Syntrophomonas wolfei* subsp. *saponavida* to *Syntrophomonas saponavida* sp. nov. comb. nov. *Syst Appl Microbiol.* 30 (5), 2007, S. 376-380.
241. **Wu C., Liu X., Dong X.** *Syntrophomonas cellicola* sp. nov., a spore-forming syntrophic bacterium isolated from a distilled-spirit-fermenting cellar, and assignment of *Syntrophospora bryantii* to *Syntrophomonas bryantii* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56 (Pt 10), 2006, S. 2331-2335.
242. **Chouari R., Le Paslier D., Daegelen P., Ginestet P., Weissenbach J., Sghir A.** Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. *Environ Microbiol.* 7 (8), 2005, S. 1104-1115.

243. **Rivière D., Desvignes V., Pelletier E., Chaussonnerie S., Guermazi S., Weissenbach J., Li T., Camacho P., Sghir A.** Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *ISME J.* 3 (6), 2009, S. 700-714.
244. **Schauer-Gimenez A.E., Zitomer D.H., Maki J.S., Struble C.A.** Bioaugmentation for improved recovery of anaerobic digesters after toxicant exposure. *Water Res.* 44 (12), 2010, S. 3555-3564.
245. **Borrel G., Parisot N., Harris H.M., Peyretailade E., Gaci N., Tottey W., Bardot O., Raymann K., Gribaldo S., Peyret P., O'Toole P.W., Brugère J.F.** Comparative genomics highlights the unique biology of *Methanomassiliicoccales*, a *Thermoplasmatales*-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine. *BMC Genomics.* 15, 2014, S. 679.
246. **Iino T., Tamaki H., Tamazawa S., Ueno Y., Ohkuma M., Suzuki K., Igarashi Y., Haruta S.** Candidatus *Methanogranum caenicola*: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of *Methanomassiliicoccaceae* fam. nov. and *Methanomassiliicoccales* ord. nov., for a methanogenic lineage of the class *Thermoplasmata*. *Microbes Environ.* 28 (2), 2013, S. 244-250.
247. **Saito Y., Aoki M., Hatamoto M., Yamaguchi T., Takai K., Imachi H.** Presence of a novel methanogenic archaeal lineage in anaerobic digesters inferred from mcrA and 16S rRNA gene phylogenetic analyses. *Journal of Water and Environment Technology.* 13 (3), 2015, S. 279-289.
248. **Brugère J.F., Borrel G., Gaci N., Tottey W., O'Toole P.W., Malpuech-Brugère C.** Archaeobiotics: proposed therapeutic use of archaea to prevent trimethylaminuria and cardiovascular disease. *Gut Microbes.* 5 (1), 2014, S. 5-10.
249. **Dridi B., Fardeau M.L., Ollivier B., Raoult D., Drancourt M.** *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62 (Pt 8), 2012, S. 1902-1907.
250. **Olliver B.M., Mah R.A., Garcia J.L., Boone D.R.** Isolation and Characterization of *Methanogenium bourgense* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 36 (2), 1986, S. 297-301.
251. **Maus I., Wibberg D., Stantscheff R., Stolze Y., Blom J., Eikmeyer F.G., Fracowiak J., König H., Pühler A., Schlüter A.** Insights into the annotated genome sequence of *Methanoculleus bourgensis* MS2(T), related to dominant methanogens in biogas-producing plants. *J Biotechnol.* 201, 2015, S. 43-53.
252. **Goberna M., Insam H., Franke-Whittle I.H.** Effect of biowaste sludge maturation on the diversity of thermophilic Bacteria and Archaea in an anaerobic reactor. *Appl Environ Microbiol.* 75 (8), 2009, S. 2566-2572.
253. **Weiss A., Jérôme V., Burghardt D., Likke L., Peiffer S., Hofstetter E.M., Gabler R., Freitag R.** Investigation of factors influencing biogas production in a large-scale thermophilic municipal biogas plant. *Appl Microbiol Biotechnol.* 84 (5), 2009, S. 987-1001.
254. **Maus I., Wibberg D., Stantscheff R., Cibis K., Eikmeyer F.G., König H., Pühler A., Schlüter A.** Complete genome sequence of the hydrogenotrophic archaeon *Methanobacterium* sp. Mb1 isolated from a production-scale biogas plant. *J Biotechnol.* 168 (4), 2013, S. 734-736.
255. **Biavati B., Vasta M., Ferry J.G.** Isolation and characterization of "*Methanosphaera cuniculi*" sp. nov. *Appl Environ Microbiol.* 54 (3), 1988, S. 768-771.
256. **Miller T.L., Wolin M.J.** *Methanosphaera stadtmaniae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. *Arch Microbiol.* 141 (2), 1985, S. 116-122.
257. **Fricke W.F., Seedorf H., Henne A., Krüer M., Liesegang H., Hedderich R., Gottschalk G., Thauer R.K.** The genome sequence of *Methanosphaera stadtmanae* reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H₂ for methane formation and ATP synthesis. *J Bacteriol.* 188 (2), 2006, S. 642-658.

258. **Weiss A., Jérôme V., Freitag R., Mayer H.K.** Diversity of the resident microbiota in a thermophilic municipal biogas plant. *Appl Microbiol Biotechnol.* 81 (1), 2008, S. 163-173.
259. **Akarsubasi A.T., Ince O., Kirdar B., Oz N.A., Orhon D., Curtis T.P., Head I.M., Ince B.K.** Effect of wastewater composition on archaeal population diversity. *Water Res.* 39 (8), 2005, S. 1576-1584.
260. **Stantscheff R., Kuever J., Rabenstein A., Seyfarth K., Dröge S., König H.** Isolation and differentiation of methanogenic Archaea from mesophilic corn-fed on-farm biogas plants with special emphasis on the genus *Methanobacterium*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98 (12), 2014, S. 5719-5735.
261. **Maus I., Stantscheff R., Wibberg D1, Stolze Y., Winkler A., Pühler A., König H., Schlüter A.** Complete genome sequence of the methanogenic neotype strain *Methanobacterium formicicum* MF(T.). *J Biotechnol.* 192 Pt A, 2014, S. 40-41.
262. **Hook S.E., Steele M.A., Northwood K.S., Wright A.D., McBride B.W.** Impact of high-concentrate feeding and low ruminal pH on methanogens and protozoa in the rumen of dairy cows. *Microb Ecol.* 62 (1), 2011, S. 94-105.
263. **Saengkerdsab S., Anderson R.C., Wilkinson H.H., Kim W.K., Nisbet D.J., Ricke S.C.** Identification and quantification of methanogenic Archaea in adult chicken ceca. *Appl Environ Microbiol.* 73 (1), 2007, S. 353-356.
264. **Sirohi S.K., Chaudhary P.P., Singh N., Singh D., Puniya A.K.** The 16S rRNA and mcrA gene based comparative diversity of methanogens in cattle fed on high fibre based diet. *Gene.* 523 (2), 2013, S. 161-166.
265. **Savant D.V., Ranade D.R.** Application of *Methanobrevibacter acididurans* in anaerobic digestion. *Water Sci Technol.* 50 (6), 2004, S. 109-114.
266. **Savant D.V., Shouche Y.S., Prakash S., Ranade D.R.** *Methanobrevibacter acididurans* sp. nov., a novel methanogen from a sour anaerobic digester. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52 (Pt 4), 2002, S. 1081-1087.
267. **Acharya B.K., Pathak H., Mohana S., Shouche Y., Singh V., Madamwar D.** Kinetic modelling and microbial community assessment of anaerobic biphasic fixed film bioreactor treating distillery spent wash. *Water Res.* 45 (14), 2011, S. 4248-4259.
268. **Collins G., O'Connor L., Mahony T., Gieseke A., de Beer D., O'Flaherty V.** Distribution, localization, and phylogeny of abundant populations of *Crenarchaeota* in anaerobic granular sludge. *Appl Environ Microbiol.* 71 (11), 2005, S. 7523-7527.
269. **Enright A.M., McGrath V., Gill D., Collins G., O'Flaherty V.** Effect of seed sludge and operation conditions on performance and archaeal community structure of low-temperature anaerobic solvent-degrading bioreactors. *Syst Appl Microbiol.* 32 (1), 2009, S. 65-79.
270. **Chen S., He Q.** Distinctive non-methanogen archaeal populations in anaerobic digestion. *Appl Microbiol Biotechnol.* 100 (1), 2016, S. 419-430.
271. **Meng J., Xu J., Qin D., He Y., Xiao X., Wang F.** Genetic and functional properties of uncultivated MCG Archaea assessed by metagenome and gene expression analyses. *ISME J.* 8 (3), 2014, S. 650-659.
272. **Lloyd K.G., Schreiber L., Petersen D.G., Kjeldsen K.U., Lever M.A., Steen A.D., Stepanauskas R., Richter M., Kleindienst S., Lenk S., Schramm A., Jørgensen B.B.** Predominant Archaea in marine sediments degrade detrital proteins. *Nature.* 496 (7444), 2013, S. 215-218.
273. **Lazar C.S., Baker B.J., Seitz K., Hyde A.S., Dick G.J., Hinrichs K.U., Teske A.P.** Genomic evidence for distinct carbon substrate preferences and ecological niches of *Bathyarchaeota* in estuarine sediments. *Environ Microbiol.* 2015.

274. **Evans P.N., Parks D.H., Chadwick G.L., Robbins S.J., Orphan V.J., Golding S.D., Tyson G.W.** Methane metabolism in the archaeal phylum *Bathyarchaeota* revealed by genome-centric metagenomics. *Science*. 350 (6259), 2015, S. 434-438.
275. **Brunk C.F., Avaniss-Aghajani E., Brunk C.A.** A computer analysis of primer and probe hybridization potential with bacterial small-subunit rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol.* 62 (3), 1996, S. 872-879.
276. **Solli L., Håvelsrud O.E., Horn S.J., Rike A.G.** A metagenomic study of the microbial communities in four parallel biogas reactors. *Biotechnol Biofuels*. 7 (1), 2014, S. 146-160.
277. **Lucas R., Kuchenbuch A., Fetzer I., Harms H., Kleinsteuber S.** Long-term monitoring reveals stable and remarkably similar microbial communities in parallel full-scale biogas reactors digesting energy crops. *FEMS Microbiol Ecol.* 91 (3), 2015.
278. **Maspolim Y., Zhou Y., Guo C., Xiao K., Ng W.J.** Determination of the archaeal and bacterial communities in two-phase and single-stage anaerobic systems by 454 pyrosequencing. *J Environ Sci (China)*. 36, 2015, S. 121-129.
279. **Xiao K., Guo C., Zhou Y., Maspolim Y., Ng W.J.** Acetic acid effects on methanogens in the second stage of a two-stage anaerobic system. *Chemosphere*. 144, 2016, S. 1498-1504.
280. **Gannoun H., Omri I., Chouari R., Khelifi E., Keskes S., Godon J.J., Hamdi M., Sghir A., Bouallagui H.** Microbial community structure associated with the high loading anaerobic codigestion of olive mill and abattoir wastewaters. *Bioresour Technol.* 201, 2016, S. 337-346.
281. **Steinberg L.M., Regan J.M.** Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. *Appl Environ Microbiol.* 74 (21), 2008, S. 6663-6671.
282. **Stets M.I., Etto R.M., Galvão C.W., Ayub R.A., Cruz L.M., Steffens M.B., Barana A.C.** Microbial community and performance of slaughterhouse wastewater treatment filters. *Genet Mol Res.* 13 (2), 2014, S. 4444-4455.
283. **Chen S., He Q.** Persistence of *Methanosaeta* populations in anaerobic digestion during process instability. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 42 (8), 2015, S. 1129-1137.
284. **Lu Q., Yi J., Yang D.** Comparative analysis of performance and microbial characteristics between high-solid and low-solid anaerobic digestion of sewage sludge under mesophilic conditions. *J Microbiol Biotechnol.* 26 (1), 2016, S. 110-119.
285. **Nettmann E., Bergmann I., Mundt K., Linke B., Klocke M.** Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and mcrA analysis. *J Appl Microbiol.* 105 (6), 2008, S. 1835-1850.
286. **Yu B., Lou Z., Zhang D., Shan A., Yuan H., Zhu N., Zhang K.** Variations of organic matters and microbial community in thermophilic anaerobic digestion of waste activated sludge with the addition of ferric salts. *Bioresour Technol.* 179, 2015, S. 291-298.
287. **Zhang L., Jahng D.** Long-term anaerobic digestion of food waste stabilized by trace elements. *Waste Manag.* 32 (8), 2012, S. 1509-1515.
288. **Bobik T.A., Olson K.D., Noll K.M., Wolfe R.S.** Evidence that the heterodisulfide of coenzyme M and 7-mercaptoheptanoylthreonine phosphate is a product of the methylreductase reaction in *Methanobacterium*. *Biochem Biophys Res Commun.* 149 (2), 1987, S. 455-460.
289. **Ellermann J., Hedderich R., Böcher R., Thauer R.K.** The final step in methane formation. Investigations with highly purified methyl-CoM reductase (component C) from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain Marburg). *Eur J Biochem.* 172 (3), 1988, S. 669-677.
290. **Deppenmeier U., Lienard T., Gottschalk G.** Novel reactions involved in energy conservation by methanogenic archaea. *FEBS Lett.* 457 (3), 1999, S. 291-297.

291. **Welte C., Deppenmeier U.** Bioenergetics and anaerobic respiratory chains of aceticlastic methanogens. *Biochim Biophys Acta*. 1837 (7), 2014, S. 1130-1147.
292. **Bäumer S., Murakami E., Brodersen J., Gottschalk G., Ragsdale S.W., Deppenmeier U.** The F420H₂:heterodisulfide oxidoreductase system from *Methanosarcina* species. 2-Hydroxyphenazine mediates electron transfer from F420H₂ dehydrogenase to heterodisulfide reductase. *FEBS Lett.* 428 (3), 1998, S. 295-298.
293. **Deppenmeier U., Blaut M., Lentjes S., Herzberg C., Gottschalk G.** Analysis of the *vhoGAC* and *vhtGAC* operons from *Methanosarcina mazei* strain Gö1, both encoding a membrane-bound hydrogenase and a cytochrome b. *Eur J Biochem.* 227 (1-2), 1995, S. 261-269.
294. **Simianu M., Murakami E., Brewer J.M., Ragsdale S.W.** Purification and properties of the heme- and iron-sulfur-containing heterodisulfide reductase from *Methanosarcina thermophila*. *Biochemistry.* 37 (28), 1998, S. 10027-10039.
295. **Setzke E., Hedderich R., Heiden S., Thauer R.K.** H₂: heterodisulfide oxidoreductase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Composition and properties. *Eur J Biochem.* 220 (1), 1994, S. 139-148.
296. **Chojnacka A., Szczesny P., Błaszczyk M.K., Zielenkiewicz U., Detman A., Salamon A., Sikora A.** Noteworthy facts about a methane-producing microbial community processing acidic effluent from sugar beet molasses fermentation. *PLoS One.* 10 (5), 2015, S. e0128008.
297. **Limam R.D., Chouari R., Mazéas L, Wu T.D., Li T., Grossin-Debattista J., Guerquin-Kern J.L., Saidi M., Landoulsi A., Sghir A., Bouchez T.** Members of the uncultured bacterial candidate division WWE1 are implicated in anaerobic digestion of cellulose. *Microbiologyopen.* 3 (2), 2014, S. 157-167.
298. **Krause L., Diaz N.N., Edwards R.A., Gartemann K.H., Krömeke H., Neuweiger H., Pühler A., Runte K.J., Schlüter A., Stoye J., Szczepanowski R., Tauch A., Goesmann A.** Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *J Biotechnol.* 136 (1-2), 2008, S. 91-101.
299. **Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S.** Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66 (3), 2002, S. 506-577.
300. **Stieb M., Schink B.** Anaerobic oxidation of fatty acids by *Clostridium bryantii* sp. nov., a sporeforming, obligately syntrophic bacterium. *Arch Microbiol.* 140 (4), 1985, S. 387-390.
301. **Anderson C.L., Schneider C.J., Erickson G.E., MacDonald J.C., Fernando S.C.** Rumen bacterial communities can be acclimated faster to high concentrate diets than currently implemented feedlot programs. *J Appl Microbiol.* 120 (3), 2016, S. 588-599.
302. **Kim E., Kim D.B., Park J.Y.** Changes of mouse gut microbiota diversity and composition by modulating dietary protein and carbohydrate contents: A pilot study. *Prev Nutr Food Sci.* 21 (1), 2016, S. 57-61.
303. **Medeiros A.W., Giongo A., Valdez F.P., Blaese de Amorim D., Tavares M., d'Azevedo P.A., Franco A.C., Frazzon J., Frazzon A.P.** Characterization of the faecal bacterial community of wild young south american (*Arctocephalus australis*) and subantarctic fur seals (*Arctocephalus tropicalis*). *FEMS Microbiol Ecol.* 92 (3), 2016.
304. **Huang X., Liu L., Wen T., Zhang J., Wang F., Cai Z.** Changes in the soil microbial community after reductive soil disinfestation and cucumber seedling cultivation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016.
305. **Schmidt O., Horn M.A., Kolb S., Drake H.L.** Temperature impacts differentially on the methanogenic food web of cellulose-supplemented peatland soil. *Environ Microbiol.* 17 (3), 2015, S. 720-723.
306. **Wegner C.E., Liesack W.** Microbial community dynamics during the early stages of plant polymer breakdown in paddy soil. *Environ Microbiol.* 2015.

307. **Park G.W., Seo C., Jung K., Chang H.N., Kim W., Kim Y.C.** A comprehensive study on volatile fatty acids production from rice straw coupled with microbial community analysis. *Bioprocess Biosyst Eng.* 38 (6), 2015, S. 1157-1166.
308. **Xia Y., Kong Y., Seviour R., Yang H.E., Forster R., Vasanthan T., McAllister T.** *In situ* identification and quantification of starch-hydrolyzing bacteria attached to barley and corn grain in the rumen of cows fed barley-based diets. *FEMS Microbiol Ecol.* 91 (8), 2015, S. fiv077.
309. **Lebuhn M., Hanreich A., Klocke M., Schlüter A., Bauer C., Pérez C.M.** Towards molecular biomarkers for biogas production from lignocellulose-rich substrates. *Anaerobe.* 29, 2014, S. 10-21.
310. **Lechner U.** Genus VII. *Sedimentibacter*. [Buchverf.] De Vos P., Garrity, G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H., Whitman W.B. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Three The Firmicutes.* s.l. : Springer, New York, 2009, S. 1137-1141.
311. **Breitenstein A., Wiegel J., Haertig C., Weiss N., Andreesen J.R., Lechner U.** Reclassification of *Clostridium hydroxybenzoicum* as *Sedimentibacter hydroxybenzoicus* gen. nov., comb. nov., and description of *Sedimentibacter saalensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52 (Pt 3), 2002, S. 801-807.
312. **Imachi H., Sakai S., Kubota T., Miyazaki M., Saito Y., Takai K.** *Sedimentibacter acidaminivorans* sp. nov., an anaerobic, amino acids-utilizing bacterium isolated from marine subsurface sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016.
313. **Li J., Rui J., Pei Z., Sun X., Zhang S., Yan Z., Wang Y., Liu X., Zheng T., Li X.** Straw- and slurry-associated prokaryotic communities differ during co-fermentation of straw and swine manure. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98 (10), 2014, S. 477147-80.
314. **Regueiro L., Carballa M., Lema J.M.** Outlining microbial community dynamics during temperature drop and subsequent recovery period in anaerobic co-digestion systems. *J Biotechnol.* 192 Pt A, 2014, S. 179-186.
315. **Rui J., Li J., Zhang S., Yan X., Wang Y., Li X.** The core populations and co-occurrence patterns of prokaryotic communities in household biogas digesters. *Biotechnol Biofuels.* 8, 2015, S. 158.
316. **Sánchez-Andrea I., Rojas-Ojeda P., Amils R., Sanz J.L.** Screening of anaerobic activities in sediments of an acidic environment: Tinto River. *Extremophiles.* 16 (6), 2012, S. 829-839.
317. **Ogura T., Date Y., Tsuboi Y., Kikuchi J.** Metabolic dynamics analysis by massive data integration: application to tsunami-affected field soils in Japan. *ACS Chem Biol.* 10 (8), 2015, S. 1908-1915.
318. **Wiegel J.** Familiy I. *Clostridiaceae*. [Buchverf.] Da Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H. W.B. Whitman. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Three The Firmicutes.* s.l. : Springer, New York, 2009, S. 736-864.
319. **Wiegel J., Tanner R., Rainey F.A.** An introduction to the family *Clostridiaceae*. [Buchverf.] Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. Stackebrandt E. *The Prokaryotes.* s.l. : Springer, New York, 2006.
320. **Güllert S., Fischer M.A., Turaev D., Noebauer B., Ilmberger N., Wemheuer B., Alawi M., Rattei T., Daniel R., Schmitz R.A., Grundhoff A., Streit W.R.** Deep metagenome and metatranscriptome analyses of microbial communities affiliated with an industrial biogas fermenter, a cow rumen, and elephant feces reveal major differences in carbohydrate hydrolysis strategies. *Biotechnol Biofuels.* 9, 2016, S. 121-140.
321. **Shimada T., Morgenroth E., Tandukar M., Pavlostathis S.G., Smith A., Raskin L., Kilian R.E.** Syntrophic acetate oxidation in two-phase (acid-methane) anaerobic digesters. *Water Sci Technol.* 64 (9), 2011, S. 1812-1820.
322. **Sun L., Müller B., Westerholm M., Schnürer A.** Syntrophic acetate oxidation in industrial CSTR biogas digesters. *J Biotechnol.* 171, 2014, S. 39-44.

323. **Westerholm M.** Biogas production through the syntrophic acetate-oxidising pathway. Characterisation and detection of syntrophic acetate-oxidising bacteria. *Dissertation*. s.l. : Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2012.
324. **Westerholm M., Roos S., Schnürer A.** *Syntrophaceticus schinkii* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from a mesophilic anaerobic filter. *FEMS Microbiol Lett.* 309 (1), 2010, S. 100-104.
325. **Westerholm M., Roos S., Schnürer A.** *Tepidanaerobacter acetatoxydans* sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from two ammonium-enriched mesophilic methanogenic processes. *Syst Appl Microbiol.* 34 (4), 2011, S. 260-266.
326. **Lee Y.J., Romanek C.S., Mills G.L., Davis R.C., Whitman W.B., Wiegel J.** *Gracilibacter thermotolerans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermotolerant bacterium from a constructed wetland receiving acid sulfate water. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56 (Pt 9), 2006, S. 2089-2093.
327. **Kim W., Hwang K., Shin S.G., Lee S., Hwang S.** Effect of high temperature on bacterial community dynamics in anaerobic acidogenesis using mesophilic sludge inoculum. *Bioresour Technol.* 101 Suppl 1, 2010, S. S17-22.
328. **Liu Y., Balkwill D.L., Aldrich H.C., Drake G.R., Boone D.R.** Characterization of the anaerobic propionate-degrading syntrophs *Smithella propionica* gen. nov., sp. nov. and *Syntrophobacter wolinii*. *Int J Syst Bacteriol.* 49 Pt 2, 1999, S. 545-556.
329. **Ariesyady H.D., Ito T., Okabe S.** Functional bacterial and archaeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester. *Water Res.* 41 (7), 2007, S. 1554-1568.
330. **Yan Z., Song Z., Li D., Yuan Y., Liu X., Zheng T.** The effects of initial substrate concentration, C/N ratio, and temperature on solid-state anaerobic digestion from composting rice straw. *Bioresour Technol.* 177, 2015, S. 266-273.
331. **Yu H., Wang Q., Wang Z., Sahinkaya E., Li Y., Ma J., Wu Z.** Start-up of an anaerobic dynamic membrane digester for waste activated sludge digestion: temporal variations in microbial communities. *PLoS One.* 9 (4), 2014, S. e93710.
332. **Willems A., De Ley J., Gillis M., Kersters K.** *Comamonadaceae*, a New Family Encompassing the Acidovorans rRNA Complex, including *Variovorax paradoxus* gen. nov., comb. nov. for *Alcaligenes paradoxus* (Davis 1969). *Int J Syst Bacteriol.* 41 (3), 1991, S. 445-450.
333. **Ge H., Batstone D.J., Keller J.** Biological phosphorus removal from abattoir wastewater at very short sludge ages mediated by novel PAO clade Comamonadaceae. *Water Res.* 69, 2015, S. 173-182.
334. **Wu Y., Shukal S., Mukherjee M., Cao B.** Involvement in denitrification is beneficial to the biofilm lifestyle of *Comamonas testosteroni*: A mechanistic study and its environmental implications. *Environ Sci Technol.* 49 (19), 2015, S. 11551-11559.
335. **Xin X., He J., Wang Y., Feng J., Qiu W.** Role of aeration intensity on performance and microbial community profiles in a sequencing batch reaction kettle (SBRK) for wastewater nutrients rapid removal. *Bioresour Technol.* 201, 2016, S. 140-147.
336. **Poirier S., Desmond-Le Quémener E., Madigou C., Bouchez T., Chapleur O.** Anaerobic digestion of biowaste under extreme ammonia concentration: Identification of key microbial phylotypes. *Bioresour Technol.* 207, 2016, S. 92-101.
337. **Gasch C., Hildebrandt I., Rebbe F., Röske I.** Enzymatic monitoring and control of a two-phase batch digester leaching system with integrated anaerobic filter. *Energy Sustain Soc.* 3, 2013, S. 10.
338. **Moestedt J., Müller B., Westerholm M., Schnürer A.** Ammonia threshold for inhibition of anaerobic digestion of thin stillage and the importance of organic loading rate. *Microb Biotechnol.* 9 (2), 2016, S. 180-194.

339. **Fotidis I.A., Wang H., Fiedel N.R., Luo G., Karakashev D.B., Angelidaki I.** Bioaugmentation as a solution to increase methane production from an ammonia-rich substrate. *Environ Sci Technol.* 48 (13), 2014, S. 7669-7676.
340. **Song M., Shin S.G., Hwang S.** Methanogenic population dynamics assessed by real-time quantitative PCR in sludge granule in upflow anaerobic sludge blanket treating swine wastewater. *Bioresour Technol.* 101 Suppl 1, 2010, S. S23-28.
341. **Zhang C., Yuan Q., Lu Y.** Inhibitory effects of ammonia on methanogen mcrA transcripts in anaerobic digester sludge. *FEMS Microbiol Ecol.* 87 (2), 2014, S. 368-377.
342. **Langer S.G., Ahmed S., Einfalt D., Bengelsdorf F.R., Kazda M.** Functionally redundant but dissimilar microbial communities within biogas reactors treating maize silage in co-fermentation with sugar beet silage. *Microb Biotechnol.* 8 (5), 2015, S. 828-836.
343. **Briones A., Raskin L.** Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability. *Curr Opin Biotechnol.* 14 (3), 2003, S. 270-276.
344. **McMahon K.D., Martin H.G., Hugenholtz P.** Integrating ecology into biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.* 18 (3), 2007, S. 287-292.
345. **Tilman D.** The ecological consequences of changes in biodiversity: A search for general principles. *Ecology.* 80 (5), 1999, S. 1455-1474.
346. **Koster I.W., Lettinga G.** The influence of ammonium-nitrogen on the specific activity of pelletized methanogenic sludge. *Agr Wastes.* 9 (3), 1984, S. 205-216.
347. **Angelidaki I., Ahring B.K.** Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Appl Microbiol Biot.* 38 (4), 1993, S. 560-564.
348. **Fotidis I.A., Karakashev D., Kotsopoulos T.A., Martzopoulos G.G., Angelidaki I.** Effect of ammonium and acetate on methanogenic pathway and methanogenic community composition. *FEMS Microbiol Ecol.* 83 (1), 2013, S. 38-48.
349. **Hao L., Lü F., Mazéas L., Desmond-Le Quémener E., Madigou C., Guenne A., Shao L., Bouchez T., He P.** Stable isotope probing of acetate fed anaerobic batch incubations shows a partial resistance of acetoclastic methanogenesis catalyzed by *Methanosarcina* to sudden increase of ammonia level. *Water Res.* 69, 2015, S. 90-99.
350. **De Vrieze J., Hennebel T., Boon N., Verstraete W.** *Methanosarcina*: the rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresour Technol.* 112, 2012, S. 1-9.
351. **Isa Z., Grusenmeyer S., Verstraete W.** Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: technical aspects. *Appl Environ Microbiol.* 51 (3), 1986, S. 572-579.
352. **Kayhanian M.** Performance of a high solids anaerobic digestion process under various ammonia concentrations. *J Chem Technol Biotechnol.* 59 (4), 1994, S. 349-352.
353. **Regueiro L., Carballa M., Lema J.M.** Microbiome response to controlled shifts in ammonium and LCFA levels in co-digestion systems. *J Biotechnol.* 220, 2016, S. 35-44.
354. **Luo G., Fotidis I.A., Angelidaki I.** Comparative analysis of taxonomic, functional, and metabolic patterns of microbiomes from 14 full-scale biogas reactors by metagenomic sequencing and radioisotopic analysis. *Biotechnol Biofuels.* 9, 2016, S. 51.
355. **Lerm S., Kleyböcker A., Miethling-Graff R., Alawi M., Kasina M., Liebrich M., Würdemann H.** Archaeal community composition affects the function of anaerobic co-digesters in response to organic overload. *Waste Manag.* 32 (3), 2012, S. 389-399.
356. **Franke-Whittle I.H., Walter A., Ebner C., Insam H.** Investigation into the effect of high concentrations of volatile fatty acids in anaerobic digestion on methanogenic communities. *Waste Manag.* 34 (11), 2014, S. 2080-2089.

357. **Shin S.G., Zhou B.W., Lee S., Kim W., Hwang S.** Variations in methanogenic population structure under overloading of pre-acidified high-strength organic wastewaters. *Process Biochem.* 46 (4), 2011, S. 1035-1038.
358. **Blume F., Bergmann I., Nettmann E., Schelle H., Rehde G., Mundt K., Klocke M.** Methanogenic population dynamics during semi-continuous biogas fermentation and acidification by overloading. *J Appl Microbiol.* 109 (2), 2010, S. 441-450.
359. **McMahon K.D., Zheng D., Stams A.J., Mackie R.I., Raskin L.** Microbial population dynamics during start-up and overload conditions of anaerobic digesters treating municipal solid waste and sewage sludge. *Biotechnol Bioeng.* 87 (7), 2004, S. 823-834.
360. **Li L., He Q., Ma Y., Wang X., Peng X.** A mesophilic anaerobic digester for treating food waste: process stability and microbial community analysis using pyrosequencing. *Microb Cell Fact.* 15 (1), 2016, S. 65.
361. **Kleyböcker A., Lienen T., Liebrich M., Kasina M., Kraume M., Würdemann H.** Application of an early warning indicator and CaO to maximize the time-space-yield of an completely mixed waste digester using rape seed oil as co-substrate. *Waste Manag.* 34 (3), 2014, S. 661-668.
362. **Tale V.P., Maki J.S., Struble C.A., Zitomer D.H.** Methanogen community structure-activity relationship and bioaugmentation of overloaded anaerobic digesters. *Water Res.* 45 (16), 2011, S. 5249-5256.
363. **Regueiro L., Lema J.M., Carballa M.** Key microbial communities steering the functioning of anaerobic digesters during hydraulic and organic overloading shocks. *Bioresour Technol.* 197, 2015, S. 208-216.

VI ANHANG

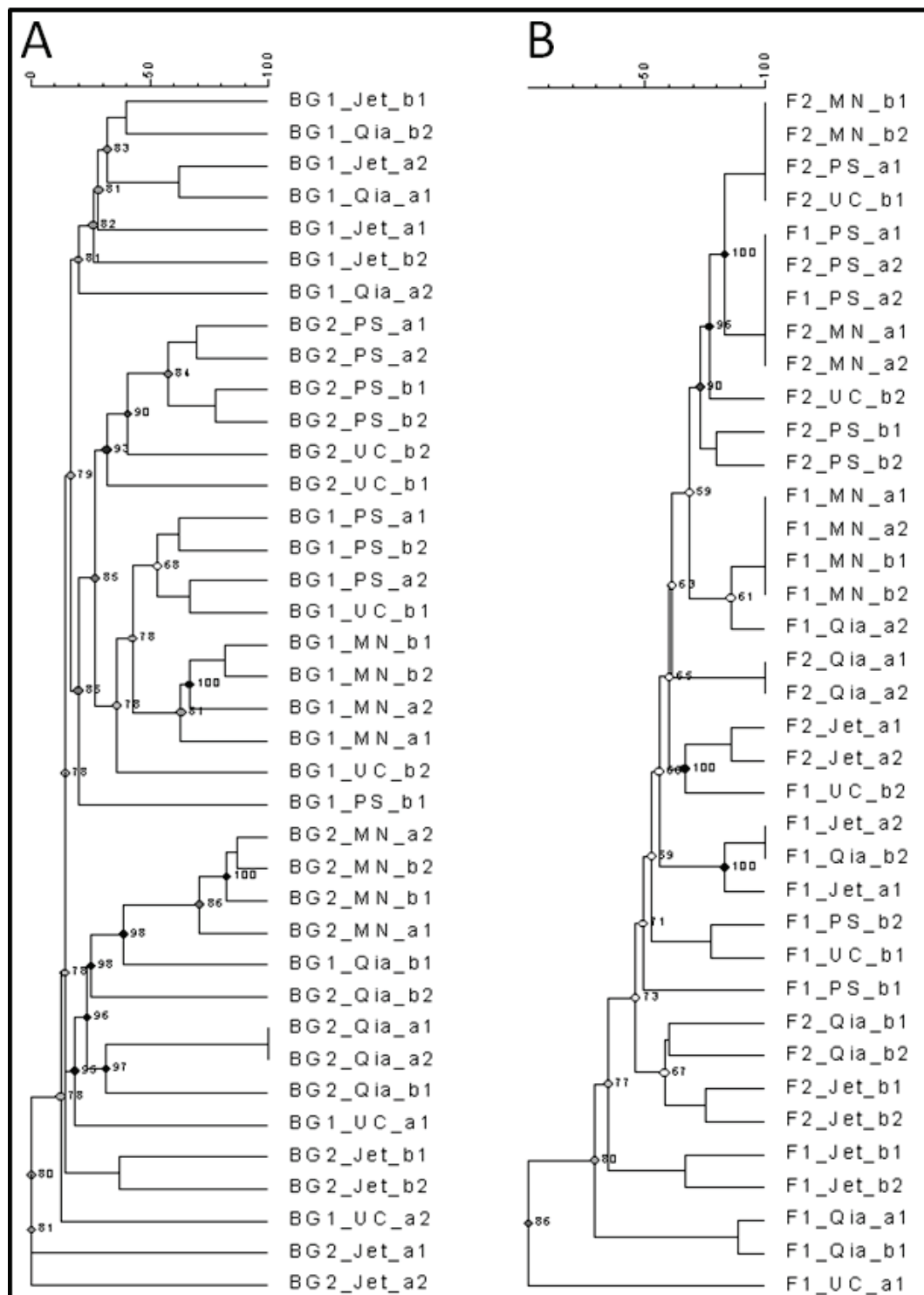


Abbildung A1: Cluster-Analyse der DGGE-Replikate bei Verwendung des *Primer-Paars* Parch519f und A915r_GC.

Die DGGE-Profile nach DNA-Isolation von Proben aus Anlage A (A) bzw. KA (B) mit verschiedenen Kit-Systemen wurden mit Hilfe der Software Bionumerics v6.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, B) untersucht und Dendrogramme auf Basis des Jaccard-Koeffizienten und der Clustering-Methode UPGMA berechnet. Die *bootstrap*-Werte sind an den Abzweigungen angegeben. Die Dendrogramme sind maßstabsgetreu dargestellt. BG1: Probe Mai 2013 aus Anlage A; BG2: Probe Juli 2013 aus Anlage A; F1: Probe Juli 2013 aus Anlage KA-F1; F2: Probe Juli 2013 aus Anlage KA-F2; a,b: replizierte DNA-Isolationen; 1,2: replizierte PCR-Reaktionen.

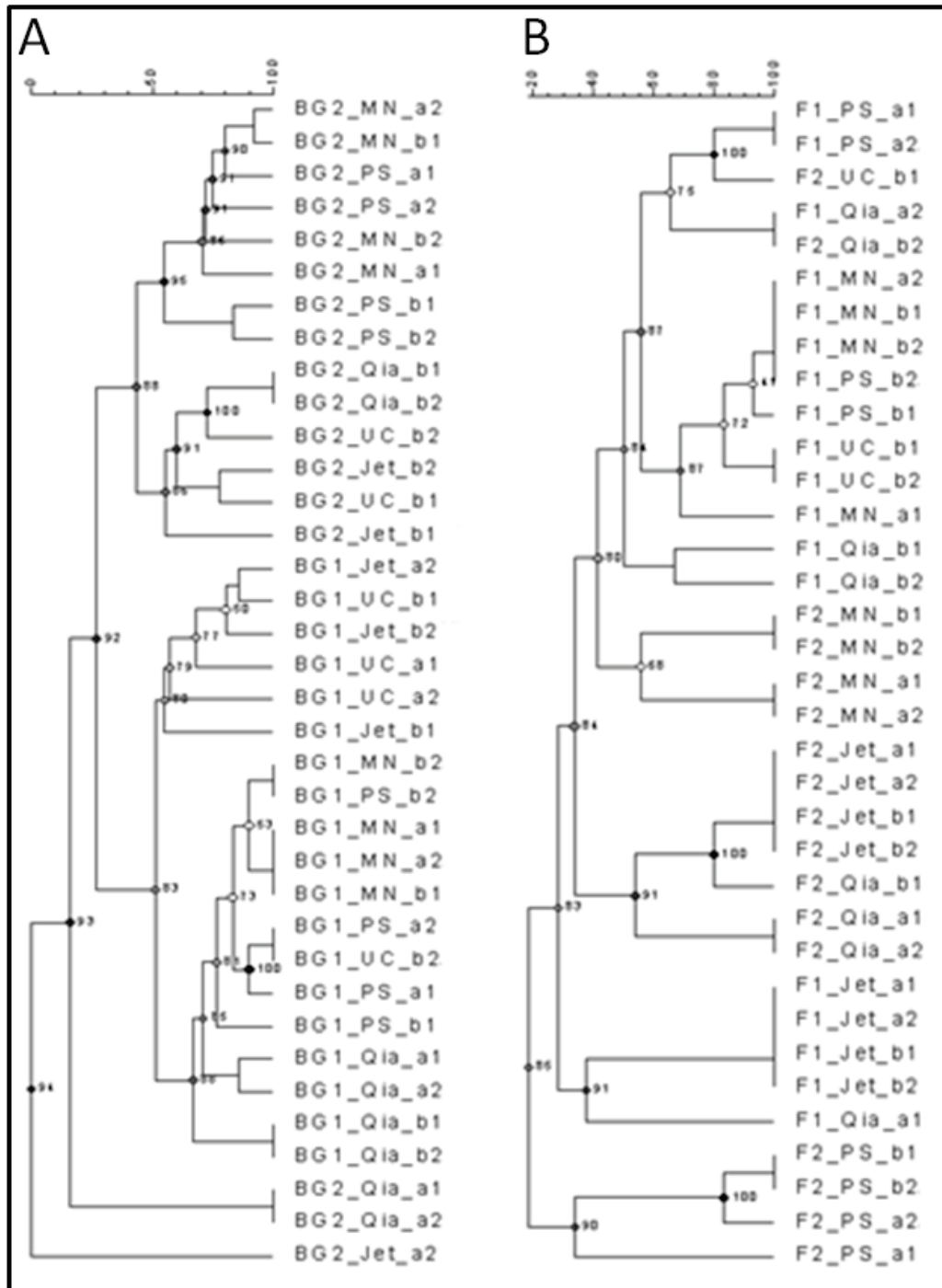


Abbildung A2: Cluster-Analyse der DGGE-Replikate bei Verwendung des *Primer-Paars* Parch340f und A915r_GC.

Die DGGE-Profile nach DNA-Isolation von Proben aus Anlage A (A) bzw. KA (B) mit verschiedenen Kit-Systemen wurden mit Hilfe der Software Bionumerics v6.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, B) untersucht und Dendrogramme auf Basis des Jaccard-Koeffizienten und der Clustering-Methode UPGMA berechnet. Die *bootstrap*-Werte sind an den Abzweigungen angegeben. Die Dendrogramme sind maßstabsgetreu dargestellt. BG1: Probe Mai 2013 aus Anlage A; BG2: Probe Juli 2013 aus Anlage A; F1: Probe Juli 2013 aus Anlage KA-F1; F2: Probe Juli 2013 aus Anlage KA-F2; a,b: replizierte DNA-Isolationen; 1,2: replizierte PCR-Reaktionen.

Tabelle A1: NH_4^+ -N-Konzentrationen [g CaCO_3/l] der Proben während des ersten Ammonium-Toxizitäts-Versuches.

	Kontrolle	leichte Hemmung	schwere Hemmung	"Erholung"
14.06.2014	3,85	3,78	3,75	3,80
16.06.2014	3,99	3,92	3,97	3,84
17.06.2014	3,84	3,82	3,76	3,71
18.06.2014	3,94	3,88	3,91	3,97
20.06.2014	3,81	3,76	3,74	3,73
22.06.2014	3,88	3,87	3,84	4,02
23.06.2014	3,96	3,94	3,97	3,97
24.06.2014	3,95	4,06	4,04	4,09
25.06.2014	4,03	4,11	4,02	4,07
26.06.2014	4,26	4,33	4,27	4,27
28.06.2014	4,03	4,12	4,05	4,10
30.06.2014	3,99	4,09	4,15	4,17
01.07.2014	4,01	4,27	4,25	4,33
02.07.2014	k.A.	4,78	4,73	4,78
03.07.2014	3,74	4,56	4,47	4,96
04.07.2014	4,02	5,17	5,19	5,16
06.07.2014	3,69	5,86	5,54	5,94
07.07.2014	3,77	6,25	5,71	6,25
08.07.2014	4,07	6,92	6,46	6,79
09.07.2014	4,17	6,92	6,65	6,97
10.07.2014	3,93	6,50	6,34	6,39
11.07.2014	4,00	6,67	6,54	6,59
12.07.2014	4,09	7,93	7,46	7,53
13.07.2014	3,97	8,91	8,04	8,12
14.07.2014	4,17	9,67	8,52	8,54
15.07.2014	3,88	9,59	9,34	9,07
16.07.2014	3,92	10,18	9,97	10,08
17.07.2014	-	-	13,57	12,01
18.07.2014	-	-	14,23	11,11
21.07.2014	-	-	14,55	11,02
22.07.2014	-	-	15,53	11,15
23.07.2014	-	-	15,03	10,50
24.07.2014	-	-	16,61	12,10
25.07.2014	-	-	13,55	9,70
28.07.2014	-	-	16,93	11,27
29.07.2014	-	-	-	11,57
30.07.2014	-	-	-	11,12
31.07.2014	-	-	-	10,68
01.08.2014	-	-	-	10,82
04.08.2014	-	-	-	10,95
05.08.2014	-	-	-	9,56
06.08.2014	-	-	-	11,57

Tabelle A1 (Fortsetzung): NH_4^+ -N-Konzentrationen [g CaCO_3/l] der Proben während des ersten Ammonium-Toxizitäts-Versuches.

	Kontrolle	leichte Hemmung	schwere Hemmung	"Erholung"
07.08.2014	-	-	-	10,99
08.08.2014	-	-	-	10,79
14.08.2014	-	-	-	10,56
22.08.2014	-	-	-	10,22
01.09.2014	-	-	-	13,68
15.09.2014	-	-	-	10,70

Die Daten wurden durch die Firma Bioreact/Bonalytic (Troisdorf, DEU) erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Grau hinterlegt sind jeweils die Tage der Zufütterung von Ammoniakwasser (23.06.2014) bzw. Harnstoff. k. A.: Wert wurde nicht bestimmt.

Tabelle A2: pH-Werte der Proben während des ersten Ammonium-Toxizitäts-Versuches.

	Kontrolle	leichte Hemmung	schwere Hemmung	"Erholung"
13.06.2014	8,3	8,2	8,2	8,2
14.06.2014	8,2	8,2	8,1	8,1
16.06.2014	8,3	8,2	8,2	8,2
17.06.2014	8,1	8,1	8,1	8,1
18.06.2014	8,2	8,2	8,1	8,1
20.06.2014	8,1	8,2	8,1	8,1
22.06.2014	8,4	8,3	8,3	8,2
23.06.2014	8,1	8,1	8,1	8,2
24.06.2014	7,9	8,1	8,1	8,0
25.06.2014	8,0	8,0	8,1	8,1
26.06.2014	8,1	8,2	8,2	8,2
28.06.2014	8,2	8,3	8,3	8,1
30.06.2014	8,1	8,2	8,3	8,1
01.07.2014	8,1	8,1	8,2	8,1
02.07.2014	k. A.	8,3	8,3	8,3
03.07.2014	8,1	8,4	8,3	8,4
04.07.2014	8,1	8,3	8,3	8,3
06.07.2014	8,2	8,5	8,5	8,5
07.07.2014	8,2	8,5	8,5	8,5
08.07.2014	k. A.	8,5	8,5	8,5
09.07.2014	8,0	8,5	8,4	8,4
10.07.2014	8,0	8,5	8,4	8,4
11.07.2014	8,1	8,5	8,3	8,37
12.07.2014	8,2	8,9	8,7	8,67
13.07.2014	8,2	9,0	8,8	8,74
14.07.2014	8,0	8,7	8,4	8,52
15.07.2014	7,9	8,7	8,5	8,51
16.07.2014	8,1	8,9	8,8	8,76
17.07.2014	-	-	9,0	8,93
18.07.2014	-	-	8,8	8,70

Tabelle A2 (Fortsetzung): pH-Werte der Proben während des ersten Ammonium-Toxizitäts-Versuches.

	Kontrolle	leichte Hemmung	schwere Hemmung	"Erholung"
21.07.2014	-	-	8,9	8,84
22.07.2014	-	-	8,8	8,59
23.07.2014	-	-	8,9	8,77
24.07.2014	-	-	8,9	8,64
25.07.2014	-	-	8,8	8,67
28.07.2014	-	-	8,8	8,67
29.07.2014	-	-	-	8,71
30.07.2014	-	-	-	8,76
31.07.2014	-	-	-	8,8
01.08.2014	-	-	-	8,75
04.08.2014	-	-	-	8,79
05.08.2014	-	-	-	8,79
06.08.2014	-	-	-	8,73
07.08.2014	-	-	-	8,84
08.08.2014	-	-	-	8,72
14.08.2014	-	-	-	8,67
22.08.2014	-	-	-	8,58
01.09.2014	-	-	-	8,74
15.09.2014	-	-	-	8,54

Die Daten wurden durch die Firma Bioreact/Bonalytic (Troisdorf, DEU) erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Grau hinterlegt sind jeweils die Tage der Zufütterung von Ammoniakwasser (23.06.2014) bzw. Harnstoff. k. A.: Wert wurde nicht bestimmt.

Tabelle A3: FOS-Konzentrationen [g HAC_{eq}/l] der Proben während des ersten Ammonium-Toxizitäts-Versuches.

	Kontrolle	leichte Hemmung	schwere Hemmung	"Erholung"
19.05.2014	4,06	4,16	3,84	3,57
20.05.2014	3,65	3,68	3,84	3,57
21.05.2014	3,75	3,68	3,78	3,62
22.05.2014	3,83	3,70	3,88	3,76
23.05.2014	3,89	3,93	4,00	3,86
26.05.2014	3,77	3,81	3,94	3,70
28.05.2014	3,48	3,50	3,52	3,31
28.05.2014	4,09	3,95	3,66	3,57
30.05.2014	3,45	3,44	3,65	3,44
02.06.2014	3,80	3,68	3,83	3,69
04.06.2014	3,79	3,93	3,99	3,76
04.06.2014	3,46	3,53	4,01	3,76
05.06.2014	3,66	3,71	3,74	3,57
06.06.2014	3,75	3,71	3,83	3,72
08.06.2014	3,61	3,69	3,65	3,57
10.06.2014	3,58	3,45	3,54	3,54
12.06.2014	3,61	3,56	3,63	3,63

Tabelle A3 (Fortsetzung): FOS-Konzentrationen [g HAC_{eq}/l] der Proben während des ersten Ammonium-Toxizitäts-Versuches.

	Kontrolle	leichte Hemmung	schwere Hemmung	"Erholung"
12.06.2014	3,62	3,61	3,66	3,40
14.06.2014	3,49	3,51	3,60	3,61
17.06.2014	3,18	3,09	3,14	3,28
16.06.2014	3,66	3,62	3,57	3,60
18.06.2014	3,51	3,42	3,49	3,25
18.06.2014	3,35	3,26	3,47	3,31
20.06.2014	3,58	3,53	3,64	3,60
23.06.2014	3,48	3,43	3,45	3,52
23.06.2014	3,51	3,48	3,64	3,52
24.06.2014	3,48	3,44	3,48	3,43
25.06.2014	3,49	3,44	3,67	3,78
26.06.2014	3,68	3,67	3,67	3,67
28.06.2014	3,36	3,39	3,41	3,44
30.06.2014	3,45	3,76	3,77	3,74
01.07.2014	k. A.	3,66	3,64	3,60
02.07.2014	k. A.	3,51	3,53	3,48
03.07.2014	3,61	3,84	4,03	3,92
04.07.2014	3,26	3,71	3,65	3,57
06.07.2014	3,69	5,39	4,53	4,79
07.07.2014	3,73	4,78	4,65	4,75
08.07.2014	3,37	4,13	4,05	4,06
09.07.2014	3,46	4,35	4,27	4,26
10.07.2014	3,34	4,25	4,24	4,31
11.07.2014	3,31	4,16	4,14	4,03
12.07.2014	3,45	5,14	4,78	4,98
13.07.2014	3,57	5,53	5,22	5,25
14.07.2014	3,43	5,08	4,73	4,63
15.07.2014	3,66	5,73	5,24	5,28
16.07.2014	3,34	5,79	5,36	5,21
17.07.2014	-	-	7,42	6,22
18.07.2014	-	-	7,60	7,10
21.07.2014	-	-	8,48	6,94
22.07.2014	-	-	7,14	6,04
23.07.2014	-	-	7,66	6,37
24.07.2014	-	-	8,22	7,14
25.07.2014	-	-	8,10	7,06
28.07.2014	-	-	9,22	7,62
29.07.2014	-	-	-	7,80
30.07.2014	-	-	-	7,86
31.07.2014	-	-	-	7,60
01.08.2014	-	-	-	7,40
04.08.2014	-	-	-	7,38
05.08.2014	-	-	-	7,72

Tabelle A3 (Fortsetzung): FOS-Konzentrationen [g HAC_{eq}/l] der Proben während des ersten Ammonium-Toxizitäts-Versuches.

	Kontrolle	leichte Hemmung	schwere Hemmung	"Erholung"
06.08.2014	-	-	-	7,52
07.08.2014	-	-	-	7,10
08.08.2014	-	-	-	7,42
14.08.2014	-	-	-	7,16
22.08.2014	-	-	-	7,00
01.09.2014	-	-	-	8,10
15.09.2014	-	-	-	7,64

Die Daten wurden durch die Firma Bioreact/Bonalytic (Troisdorf, DEU) erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Grau hinterlegt sind jeweils die Tage der Zufütterung von Ammoniakwasser (23.06.2014) bzw. Harnstoff. k. A.: Wert wurde nicht bestimmt.

Tabelle A4: TAC-Konzentrationen [g CaCO₃/l] der Proben während des ersten Ammonium-Toxizitäts-Versuches.

	Kontrolle	leichte Hemmung	schwere Hemmung	"Erholung"
19.05.2014	22,3	22,3	22,9	21,6
20.05.2014	22,8	22,5	23,0	21,8
21.05.2014	21,5	21,4	21,6	20,7
22.05.2014	21,5	21,4	21,5	20,8
23.05.2014	22,5	22,3	22,7	21,9
26.05.2014	22,5	22,3	23,0	22,5
27.05.2014	21,5	21,4	21,5	20,8
28.05.2014	22,1	22,1	22,4	21,7
30.05.2014	21,7	21,5	22,4	21,5
02.06.2014	22,5	22,2	22,9	21,9
03.06.2014	22,0	22,0	22,3	21,5
04.06.2014	22,3	21,7	21,6	20,9
05.06.2014	22,3	22,2	22,1	21,6
06.06.2014	22,7	22,5	22,9	22,3
08.06.2014	20,2	19,8	19,8	19,8
10.06.2014	21,5	21,0	21,3	21,4
11.06.2014	20,3	19,8	20,0	20,2
12.06.2014	20,2	19,8	19,8	18,9
13.06.2014	21,0	20,4	20,4	20,3
14.06.2014	19,3	18,9	19,0	19,9
16.06.2014	21,5	21,1	20,8	21,1
17.06.2014	20,8	20,2	20,8	20,5
18.06.2014	20,8	20,3	21,0	21,1
20.06.2014	20,3	20,0	20,1	20,1
22.06.2014	19,9	19,6	19,7	20,0
23.06.2014	20,7	20,7	20,7	20,7
24.06.2014	20,8	20,8	20,8	20,7
25.06.2014	21,7	21,9	21,1	21,3
26.06.2014	21,4	21,3	21,4	21,4

Tabelle A4 (Fortsetzung): : TAC-Konzentrationen [g CaCO₃/l] der Proben während des ersten Ammonium-Toxizitäts-Versuches.

	Kontrolle	leichte Hemmung	schwere Hemmung	"Erholung"
28.06.2014	21,5	21,8	21,9	22,1
30.06.2014	21,4	21,7	21,6	22,3
01.07.2014	k. A.	21,9	21,8	22,0
02.07.2014	k. A.	23,3	23,2	23,3
03.07.2014	20,9	23,6	23,7	24,0
04.07.2014	21,4	26,0	25,9	25,9
06.07.2014	21,2	28,3	27,7	29,1
07.07.2014	20,6	29,9	27,7	29,6
08.07.2014	21,8	31,9	30,4	30,6
09.07.2014	21,7	31,4	30,7	31,6
10.07.2014	20,8	30,3	30,1	31,5
11.07.2014	21,2	30,3	30,2	30,6
12.07.2014	19,3	32,6	30,5	32,0
13.07.2014	19,4	35,9	32,3	33,3
14.07.2014	20,6	39,6	35,8	36,3
15.07.2014	21,0	42,1	38,8	38,6
16.07.2014	20,3	43,7	44,1	41,9
17.07.2014	-	-	49,0	47,0
18.07.2014	-	-	52,4	45,6
21.07.2014	-	-	60,2	47,0
22.07.2014	-	-	64,8	49,2
23.07.2014	-	-	62,2	47,8
24.07.2014	-	-	67,0	47,6
25.07.2014	-	-	69,2	48,0
28.07.2014	-	-	67,6	46,8
29.07.2014	-	-	-	45,6
30.07.2014	-	-	-	46,6
31.07.2014	-	-	-	47,0
01.08.2014	-	-	-	47,4
04.08.2014	-	-	-	45,9
05.08.2014	-	-	-	46,0
06.08.2014	-	-	-	45,0
07.08.2014	-	-	-	45,8
08.08.2014	-	-	-	44,9
14.08.2014	-	-	-	44,2
22.08.2014	-	-	-	43,2
01.09.2014	-	-	-	54,2
15.09.2014	-	-	-	46,8

Die Daten wurden durch die Firma Bioreact/Bonalytic (Troisdorf, DEU) erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Grau hinterlegt sind jeweils die Tage der Zufütterung von Ammoniakwasser (23.06.2014) bzw. Harnstoff. k. A.: Wert wurde nicht bestimmt.

Tabelle A5: NH_4^+ -N-Konzentrationen [g CaCO_3/l] der Proben während des zweiten Ammonium-Toxizitäts-Versuches.

	Kontrolle I	leichte Hemmung	Kontrolle II	schwere Hemmung	Kontrolle III	Erholung
22.01.2015	1,85	1,74	1,72	1,84	1,75	1,75
28.01.2015	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
30.01.2015	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
02.02.2015	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
03.02.2015	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
05.02.2015	2,24	2,20	2,18	2,34	2,27	2,18
09.02.2015	2,64	2,50	k. A.	k. A.	2,57	2,51
10.02.2015	2,63	2,66	k. A.	k. A.	2,63	2,72
11.02.2015	2,34	2,49	k. A.	k. A.	2,40	2,52
12.02.2015	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
13.02.2015	2,39	2,90	k. A.	k. A.	2,37	2,98
14.02.2015	2,39	3,16	k. A.	k. A.	2,43	3,13
16.02.2015	2,47	4,90	k. A.	k. A.	2,48	3,52
17.02.2015	2,65	5,38	k. A.	k. A.	2,59	4,25
18.02.2015	-	-	k. A.	k. A.	2,70	k. A.
19.02.2015	-	-	2,80	2,91	2,74	5,07
20.02.2015	-	-	2,76	3,12	2,75	5,18
21.02.2015	-	-	2,70	3,23	2,66	5,00
23.02.2015	-	-	2,66	6,04	2,68	4,73
24.02.2015	-	-	2,79	8,05	2,77	4,80
25.02.2015	-	-	2,81	8,35	2,20	4,75
26.02.2015	-	-	-	-	k. A.	k. A.
27.02.2015	-	-	-	-	k. A.	k. A.
02.03.2015	-	-	-	-	2,59	4,10
03.03.2015	-	-	-	-	2,71	4,09
04.03.2015	-	-	-	-	2,83	4,25
05.03.2015	-	-	-	-	2,67	4,06
06.03.2015	-	-	-	-	2,63	3,92
09.03.2015	-	-	-	-	2,74	3,94
10.03.2015	-	-	-	-	2,69	3,88

Die Daten wurden durch die Firma Bioreact/Bonalytic (Troisdorf, DEU) erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Grau hinterlegt sind jeweils die Tage der Zufütterung von Harnstoff. k. A.: Wert wurde nicht bestimmt.

Tabelle A6: pH-Werte der Proben während des zweiten Ammonium-Toxizitäts-Versuches.

	Kontrolle I	leichte Hemmung	Kontrolle II	schwere Hemmung	Kontrolle III	Erholung
22.01.2015	7,9	7,8	8,1	7,9	7,9	7,9
28.01.2015	7,8	7,8	7,8	7,8	7,9	7,8
30.01.2015	7,9	7,7	7,9	7,8	7,8	7,8
02.02.2015	7,8	7,8	7,9	7,9	7,9	7,8
03.02.2015	7,9	7,8	7,9	7,9	7,9	8,0
05.02.2015	7,9	7,9	7,9	8,0	7,9	8,0
09.02.2015	7,9	7,8	k. A.	k. A.	7,9	7,9
10.02.2015	7,8	7,8	k. A.	k. A.	7,8	7,9
11.02.2015	7,8	7,9	k. A.	k. A.	7,8	7,9
12.02.2015	k. A	k. A	k. A	k. A	k. A	k. A
13.02.2015	7,9	8,1	k. A.	k. A.	7,9	8,1
14.02.2015	7,7	8,1	k. A.	k. A.	7,8	8,0
16.02.2015	8,0	8,5	k. A.	k. A.	8,0	8,1
17.02.2015	7,9	8,3	k. A.	k. A.	7,8	8,2
18.02.2015	-	-	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
19.02.2015	-	-	7,8	7,9	7,8	8,2
20.02.2015	-	-	7,9	8,0	7,9	8,2
21.02.2015	-	-	8,0	8,3	8,1	8,3
23.02.2015	-	-	7,9	8,6	7,9	8,1
24.02.2015	-	-	7,8	8,6	7,8	8,0
25.02.2015	-	-	7,9	8,8	7,9	8,2
26.02.2015	-	-	-	-	k. A.	k. A.
27.02.2015	-	-	-	-	7,8	8,1
02.03.2015	-	-	-	-	7,8	8,1
03.03.2015	-	-	-	-	7,9	8,1
04.03.2015	-	-	-	-	7,8	8,0
05.03.2015	-	-	-	-	7,8	8,0
06.03.2015	-	-	-	-	7,8	8,0
09.03.2015	-	-	-	-	7,8	7,9
10.03.2015	-	-	-	-	7,8	8,0

Die Daten wurden durch die Firma Bioreact/Bonalytic (Troisdorf, DEU) erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Grau hinterlegt sind jeweils die Tage der Zufütterung von Harnstoff. k. A.: Wert wurde nicht bestimmt.

Tabelle A7: FOS-Konzentrationen [g HAC_{eq}/l] der Proben während des zweiten Ammonium-Toxizitäts-Versuches.

	Kontrolle I	leichte Hemmung	Kontrolle II	schwere Hemmung	Kontrolle III	Erholung
22.01.2015	2,17	2,12	1,98	2,12	2,00	2,06
28.01.2015	2,46	2,29	2,47	2,66	2,54	2,41
30.01.2015	2,29	2,45	2,34	2,20	2,35	2,17
02.02.2015	2,34	2,64	2,55	2,84	2,61	2,50
03.02.2015	2,75	2,50	2,53	2,77	2,89	2,67
05.02.2015	2,78	2,63	2,79	2,74	2,77	2,79
09.02.2015	2,73	2,58	k. A.	k. A.	2,69	2,60
10.02.2015	3,23	3,18	k. A.	k. A.	3,22	3,27
11.02.2015	2,62	2,61	k. A.	k. A.	2,75	2,82
12.02.2015	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
13.02.2015	3,03	3,12	k. A.	k. A.	3,13	3,31
14.02.2015	3,35	3,54	k. A.	k. A.	3,22	3,53
16.02.2015	3,14	4,06	k. A.	k. A.	3,15	3,63
17.02.2015	3,00	4,44	k. A.	k. A.	3,12	3,54
18.02.2015	-	-	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
19.02.2015	-	-	3,07	3,22	3,11	4,16
20.02.2015	-	-	2,99	3,25	3,09	4,20
21.02.2015	-	-	2,92	3,22	2,98	4,02
23.02.2015	-	-	3,37	5,00	3,33	4,63
24.02.2015	-	-	3,28	6,28	3,32	4,70
25.02.2015	-	-	3,30	6,88	3,40	4,66
26.02.2015	-	-	-	-	k. A.	k. A.
27.02.2015	-	-	-	-	3,31	4,57
02.03.2015	-	-	-	-	2,85	3,76
03.03.2015	-	-	-	-	3,39	4,54
04.03.2015	-	-	-	-	3,35	4,30
05.03.2015	-	-	-	-	3,37	4,30
06.03.2015	-	-	-	-	3,37	4,46
09.03.2015	-	-	-	-	3,41	4,64
10.03.2015	-	-	-	-	3,30	3,66

Die Daten wurden durch die Firma Bioreact/Bonalytic (Troisdorf, DEU) erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Grau hinterlegt sind jeweils die Tage der Zufütterung von Harnstoff. k. A.: Wert wurde nicht bestimmt.

Tabelle A8: TAC-Konzentrationen [g CaCO₃/l] der Proben während des zweiten Ammonium-Toxizitäts-Versuches.

	Kontrolle I	leichte Hemmung	Kontrolle II	schwere Hemmung	Kontrolle III	Erholung
22.01.2015	11,0	10,5	10,3	10,9	10,4	10,4
28.01.2015	12,8	12,0	12,7	13,5	14,0	12,9
30.01.2015	13,1	14,0	13,5	13,3	13,2	12,5
02.02.2015	12,7	12,6	13,3	13,9	13,5	13,3
03.02.2015	13,4	12,6	12,3	13,9	13,8	13,2
05.02.2015	13,7	13,0	13,5	14,0	14,1	13,3
09.02.2015	15,3	14,3	k. A.	k. A.	15,0	14,5
10.02.2015	14,7	14,5	k. A.	k. A.	14,7	14,9
11.02.2015	14,7	14,8	k. A.	k. A.	14,7	15,4
12.02.2015	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
13.02.2015	14,9	16,5	k. A.	k. A.	14,8	16,7
14.02.2015	14,8	17,0	k. A.	k. A.	15,0	17,3
16.02.2015	15,3	23,9	k. A.	k. A.	15,6	18,9
17.02.2015	15,1	23,6	k. A.	k. A.	15,0	20,4
18.02.2015	-	-	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
19.02.2015	-	-	15,1	15,8	15,2	22,1
20.02.2015	-	-	15,2	16,5	15,4	22,6
21.02.2015	-	-	15,7	17,7	15,8	22,8
23.02.2015	-	-	15,5	27,0	15,7	22,2
24.02.2015	-	-	15,2	31,9	15,4	21,1
25.02.2015	-	-	15,6	34,4	16,0	21,3
26.02.2015	-	-	-	-	k. A.	k. A.
27.02.2015	-	-	-	-	15,6	20,8
02.03.2015	-	-	-	-	16,6	21,3
03.03.2015	-	-	-	-	15,5	19,8
04.03.2015	-	-	-	-	15,3	19,3
05.03.2015	-	-	-	-	16,2	20,0
06.03.2015	-	-	-	-	15,8	19,6
09.03.2015	-	-	-	-	16,6	19,4
10.03.2015	-	-	-	-	15,4	18,6

Die Daten wurden durch die Firma Bioreact/Bonalytic (Troisdorf, DEU) erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Grau hinterlegt sind jeweils die Tage der Zufütterung von Harnstoff. k. A.: Wert wurde nicht bestimmt.

Tabelle A9: pH-Werte der Proben während des ersten Versauerungsversuches.

	Kontrolle I	Versauerung	Kontrolle II	Erholung
07.11.2014	8,0	8,0	8,0	8,1
08.11.2014	8,1	8,1	8,0	8,0
10.11.2014	8,3	8,3	8,2	8,2
11.11.2014	k. A.	8,2	8,1	8,1
12.11.2014	k. A.	8,2	k. A.	8,2
14.11.2014	k. A.	8,3	k. A.	8,4
15.11.2014	8,1	8,1	8,1	8,1
17.11.2014	k. A.	8,3	k. A.	8,4
19.11.2014	k. A.	8,2	k. A.	8,2
20.11.2014	k. A.	8,1	k. A.	8,2
21.11.2014	8,4	8,3	8,3	k. A.
22.11.2014	k. A.	8,2	k. A.	8,2
24.11.2014	8,4	8,4	8,3	k. A.
25.11.2014	k. A.	8,3	k. A.	k. A.
26.11.2014	8,3	8,1	8,3	8,2
27.11.2014	k. A.	8,3	k. A.	k. A.
28.11.2014	k. A.	8,1	k. A.	8,2
29.11.2014	k. A.	8,1	k. A.	k. A.
01.12.2014	8,5	8,4	8,4	8,5
02.12.2014	8,2	8,2	8,1	8,1
03.12.2014	8,2	k. A.	8,2	7,7
04.12.2014	k. A.	7,8	8,2	k. A.
05.12.2014	-	-	8,2	8,3
06.12.2014	-	-	k. A.	8,2
08.12.2014	-	-	8,2	8,2
09.12.2014	-	-	8,2	k. A.
10.12.2014	-	-	8,2	8,1

Die Daten wurden durch die Firma Bioreact/Bonalytic (Troisdorf, DEU) erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Grau hinterlegt sind jeweils die Tage der Zufütterung von Glucose. k. A.: Wert wurde nicht bestimmt.

Tabelle A10: Essigsäure-Konzentrationen [g/l] der Proben während des ersten Versauerungsversuches.

	Kontrolle I	Versauerung	Kontrolle II	Erholung
22.11.2014	k. A.	0,08	k. A.	0,06
24.11.2014	0,09	k. A.	0,07	k. A.
25.11.2014	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
26.11.2014	k. A.	0,11	k. A.	0,12
27.11.2014	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
28.11.2014	k. A.	0,09	k. A.	0,11
29.11.2014	k. A.	0,53	k. A.	k. A.
01.12.2014	0,06	0,55	0,07	0,55
02.12.2014	0,08	0,60	0,08	0,71
03.12.2014	0,13	1,45	0,10	1,13
04.12.2014	-	-	k. A.	k. A.

Tabelle A10 (Fortsetzung): Essigsäure-Konzentrationen [g/l] der Proben während des ersten Versauerungsversuches.

	Kontrolle I	Versauerung	Kontrolle II	Erholung
06.12.2014	-	-	k. A.	0,12
08.12.2014	-	-	0,07	0,08
09.12.2014	-	-	k. A.	k. A.
10.12.2014	-	-	0,08	0,09
06.12.2014	-	-	k. A.	0,12

Die Daten wurden durch die Firma Bioreact/Bonalytic (Troisdorf, DEU) erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Grau hinterlegt sind jeweils die Tage der Zufütterung von Glucose. k. A.: Wert wurde nicht bestimmt.

Tabelle A11: Propionsäure-Konzentrationen [g/l] der Proben während des ersten Versauerungsversuches.

	Kontrolle I	Versauerung	Kontrolle II	Erholung
22.11.2014	k. A.	<0,03	k. A.	<0,03
24.11.2014	0,04	k. A.	0,03	k. A.
25.11.2014	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
26.11.2014	k. A.	<0,03	k. A.	<0,03
27.11.2014	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
28.11.2014	k. A.	<0,03	k. A.	<0,03
29.11.2014	k. A.	0,10	k. A.	k. A.
01.12.2014	0,03	0,10	0,03	0,09
02.12.2014	<0,03	0,08	0,03	0,09
03.12.2014	<0,03	0,13	<0,03	0,10
04.12.2014	k. A.	0,14	k. A.	k. A.
05.12.2014	-	-	<0,03	0,03
06.12.2014	-	-	k. A.	<0,03
08.12.2014	-	-	<0,03	<0,03
09.12.2014	-	-	k. A.	k. A.
10.12.2014	-	-	0,034	<0,03

Die Daten wurden durch die Firma Bioreact/Bonalytic (Troisdorf, DEU) erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Grau hinterlegt sind jeweils die Tage der Zufütterung von Glucose. k. A.: Wert wurde nicht bestimmt.

Tabelle A12: FOS-Konzentrationen [g/l] der Proben während des ersten Versauerungsversuches.

	Kontrolle I	Versauerung	Kontrolle II	Erholung
07.11.2014	4,28	4,31	4,28	3,82
08.11.2014	4,20	4,32	4,26	4,14
10.11.2014	4,12	4,41	4,10	4,30
11.11.2014	k. A.	4,03	4,20	4,05
12.11.2014	k. A.	3,90	k. A.	3,79
14.11.2014	k. A.	4,12	k. A.	3,94
15.11.2014	4,14	4,17	4,11	4,03
17.11.2014	k. A.	3,94	k. A.	3,75
19.11.2014	k. A.	3,87	k. A.	3,84
20.11.2014	k. A.	3,70	k. A.	3,49

Tabelle A12 (Fortsetzung): FOS-Konzentrationen [g/l] der Proben während des ersten Versauerungsversuches.

	Kontrolle I	Versauerung	Kontrolle II	Erholung
22.11.2014	k. A.	3,87	k. A.	3,79
24.11.2014	3,84	3,96	3,88	k. A.
25.11.2014	k. A.	3,76	k. A.	k. A.
26.11.2014	3,71	3,76	3,64	3,64
27.11.2014	k. A.	3,57	k. A.	k. A.
28.11.2014	k. A.	4,06	k. A.	3,99
29.11.2014	k. A.	4,23	k. A.	k. A.
01.12.2014	3,30	4,34	3,26	3,17
02.12.2014	3,93	4,36	3,85	4,32
03.12.2014	3,76	5,17	3,70	4,87
04.12.2014	-	-	3,89	k. A.
05.12.2014	-	-	3,74	3,51
06.12.2014	-	-	k. A.	3,95
08.12.2014	-	-	3,98	3,93
09.12.2014	-	-	3,92	k. A.
10.12.2014	-	-	3,78	3,90

Die Daten wurden durch die Firma Bioreact/Bonalytic (Troisdorf, DEU) erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Grau hinterlegt sind jeweils die Tage der Zufütterung von Glucose. k. A.: Wert wurde nicht bestimmt.

Tabelle A13: FOS/TAC-Quotient der Proben während des ersten Versauerungsversuches.

	Kontrolle I	Versauerung	Kontrolle II	Erholung
07.11.2014	0,19	0,20	0,19	0,18
08.11.2014	0,19	0,20	0,19	0,19
10.11.2014	0,19	0,20	0,18	0,20
11.11.2014	k. A.	0,19	0,19	0,19
12.11.2014	k. A.	0,18	k. A.	0,18
14.11.2014	k. A.	0,18	k. A.	0,18
15.11.2014	0,18	0,19	0,18	0,19
17.11.2014	k. A.	0,18	k. A.	0,18
19.11.2014	k. A.	0,18	k. A.	0,18
20.11.2014	k. A.	0,18	k. A.	0,16
21.11.2014	0,17	0,17	0,16	k. A.
22.11.2014	k. A.	0,18	k. A.	0,18
24.11.2014	0,17	0,18	0,18	k. A.
25.11.2014	k. A.	0,18	k. A.	k. A.
26.11.2014	0,17	0,18	0,17	0,18
27.11.2014	k. A.	0,17	k. A.	k. A.
28.11.2014	k. A.	0,18	k. A.	0,18
29.11.2014	k. A.	0,20	k. A.	k. A.
01.12.2014	0,15	0,21	0,15	0,16
02.12.2014	0,18	0,21	0,17	0,21
03.12.2014	0,17	0,24	0,17	0,22

Tabelle A13 (Fortsetzung): FOS/TAC-Quotient der Proben während des ersten Versauerungsversuches.

	Kontrolle I	Versauerung	Kontrolle II	Erholung
05.12.2014	-	-	0,18	0,17
06.12.2014	-	-	k. A.	0,19
08.12.2014	-	-	0,17	0,18
09.12.2014	-	-	0,18	k. A.
10.12.2014	-	-	0,17	0,18

Die Daten wurden durch die Firma Bioreact/Bonalytic (Troisdorf, DEU) erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Grau hinterlegt sind jeweils die Tage der Zufütterung von Glucose. k. A.: Wert wurde nicht bestimmt.

Tabelle A14: pH-Werte der Proben während des zweiten Versauerungsversuches.

	Kontrolle I	Versauerung	Kontrolle II	Erholung
17.03.2015	7,76	7,74	7,78	7,79
18.03.2015	7,86	7,88	7,92	7,87
19.03.2015	7,77	7,72	7,89	7,79
20.03.2015	7,83	7,89	7,85	7,97
21.03.2015	k. A.	7,98	k. A.	7,96
23.03.2015	7,89	8,00	8,09	8,01
24.03.2015	7,90	7,92	7,95	7,94
25.03.2015	7,80	7,83	7,84	7,85
26.03.2015	7,81	7,89	7,79	7,90
27.03.2015	7,83	7,90	7,86	7,89
28.03.2015	8,07	8,04	8,01	8,08
30.03.2015	7,89	7,94	7,98	8,00
31.03.2015	7,91	7,96	8,11	7,96
01.04.2015	7,84	7,88	7,85	7,86
02.04.2015	7,88	8,04	7,83	7,88
07.04.2015	7,93	7,96	7,92	7,92
08.04.2015	8,04	7,94	7,83	7,93
09.04.2015	7,96	7,87	7,77	7,80
10.04.2015	7,87	7,84	7,87	7,90
11.04.2015	7,85	7,74	7,85	7,69
13.04.2015	7,77	7,80	7,77	7,63
14.04.2015	7,75	7,82	7,75	7,76
15.04.2015	7,84	7,73	7,83	7,80
16.04.2015	7,85	7,72	7,76	7,69
17.04.2015	7,91	7,3	7,79	7,64
18.04.2015	8,03	7,3	8,06	7,84
19.04.2015	7,83	7,1	7,88	7,69
20.04.2015	-	-	7,68	7,69
21.04.2015	-	-	7,92	7,84
22.04.2015	-	-	7,97	7,80
23.04.2015	-	-	7,77	7,76
24.04.2015	-	-	7,85	7,86

Tabelle A14 (Fortsetzung): pH-Werte der Proben während des zweiten Versauerungsversuches.

	Kontrolle I	Versauerung	Kontrolle II	Erholung
25.04.2015	-	-	7,93	7,93
27.04.2015	-	-	7,98	7,87

Die Daten wurden durch die Firma Bioreact/Bonalytic (Troisdorf, DEU) erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Es wurde täglich Speiseöl zur Induktion der Säureanreicherung zugefüttert. k. A.: Wert wurde nicht bestimmt.

Tabelle A15: Essigsäure-Konzentrationen [g/l] der Proben während des zweiten Versauerungsversuches.

	Kontrolle I	Versauerung	Kontrolle II	Erholung
17.03.2015	0,35	1,26	0,36	0,96
18.03.2015	0,30	1,42	0,44	1,19
19.03.2015	0,40	1,31	0,44	1,05
20.03.2015	0,27	1,25	0,37	0,89
21.03.2015	k. A.	1,24	k. A.	1,07
23.03.2015	0,43	1,12	0,43	1,28
24.03.2015	0,31	1,09	0,47	1,10
25.03.2015	0,29	0,79	0,38	0,83
26.03.2015	0,29	1,12	0,49	1,04
27.03.2015	0,27	0,96	0,43	0,93
28.03.2015	0,11	0,76	0,19	0,87
30.03.2015	0,29	0,72	0,40	0,80
31.03.2015	0,03	0,62	0,35	0,67
01.04.2015	0,34	0,75	0,44	0,76
02.04.2015	0,31	0,64	0,63	0,72
07.04.2015	0,28	0,42	0,38	0,46
08.04.2015	0,34	0,57	0,68	0,59
09.04.2015	0,51	0,94	1,34	0,71
10.04.2015	0,99	0,91	0,99	0,63
11.04.2015	0,53	0,52	0,53	0,36
13.04.2015	0,51	0,49	0,51	0,63
14.04.2015	0,71	0,77	0,71	0,66
15.04.2015	0,49	1,64	0,63	0,66
16.04.2015	0,44	1,87	0,72	0,70
17.04.2015	0,52	3,65	0,87	0,65
18.04.2015	0,28	4,79	0,34	0,33
19.04.2015	0,28	5,63	0,61	0,45
20.04.2015	-	-	0,56	0,44
21.04.2015	-	-	0,53	0,29
22.04.2015	-	-	0,80	0,53
23.04.2015	-	-	0,99	0,70
24.04.2015	-	-	0,81	0,67
25.04.2015	-	-	0,44	0,23
27.04.2015	-	-	0,40	0,48

Die Daten wurden durch die Firma Bioreact/Bonalytic (Troisdorf, DEU) erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Es wurde täglich Speiseöl zur Induktion der Säureanreicherung zugefüttert. k. A.: Wert wurde nicht bestimmt.

Tabelle A16: Propionsäure-Konzentrationen [g/l] der Proben während des zweiten Versauerungsversuches.

	Kontrolle I	Versauerung	Kontrolle II	Erholung
17.03.2015	0,06	0,30	0,06	0,15
18.03.2015	0,04	0,35	0,07	0,20
19.03.2015	0,06	0,36	0,06	0,19
20.03.2015	0,05	0,34	0,07	0,17
21.03.2015	k. A.	0,40	k. A.	0,22
23.03.2015	0,07	0,76	0,10	0,46
24.03.2015	0,05	0,82	0,10	0,44
25.03.2015	0,05	0,78	0,08	0,38
26.03.2015	0,29	0,75	0,07	0,32
27.03.2015	0,05	0,78	0,07	0,37
28.03.2015	0,03	0,79	0,04	0,42
30.03.2015	0,11	0,75	0,09	0,44
31.03.2015	0,09	0,58	0,06	0,34
01.04.2015	0,08	0,47	0,07	0,30
02.04.2015	0,06	0,47	0,16	0,32
07.04.2015	0,04	0,10	0,07	0,08
08.04.2015	0,07	0,15	0,09	0,13
09.04.2015	0,09	0,34	0,28	0,30
10.04.2015	0,35	0,49	0,35	0,34
11.04.2015	0,29	0,65	0,29	0,35
13.04.2015	0,10	0,19	0,10	0,29
14.04.2015	0,19	0,20	0,19	0,27
15.04.2015	0,10	0,33	0,12	0,35
16.04.2015	0,08	0,63	0,14	0,47
17.04.2015	0,07	1,15	0,25	0,50
18.04.2015	0,04	1,51	0,09	0,39
19.04.2015	0,04	2,01	0,11	0,43
20.04.2015	-	-	0,13	0,33
21.04.2015	-	-	0,11	0,07
22.04.2015	-	-	0,16	0,13
23.04.2015	-	-	0,32	0,14
24.04.2015	-	-	0,35	0,16
25.04.2015	-	-	0,33	0,06
27.04.2015	-	-	0,07	0,11

Die Daten wurden durch die Firma Bioreact/Bonalytic (Troisdorf, DEU) erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Es wurde täglich Speiseöl zur Induktion der Säureanreicherung zugefüttert. k. A.: Wert wurde nicht bestimmt.

Tabelle A 17: FOS-Konzentrationen [g/l] der Proben während des zweiten Versauerungsversuches.

	Kontrolle I	Versauerung	Kontrolle II	Erholung
17.03.2015	3,07	4,49	3,25	3,93
18.03.2015	3,41	4,63	3,38	4,05
19.03.2015	2,98	4,47	3,15	3,96
20.03.2015	2,92	4,23	3,13	3,91
21.03.2015	k. A.	4,65	k. A.	4,24
23.03.2015	3,49	4,94	3,79	4,65
24.03.2015	3,19	4,61	3,37	4,24
25.03.2015	3,10	4,52	3,40	4,14
26.03.2015	3,08	4,54	3,44	4,21
27.03.2015	3,33	4,52	3,72	4,23
28.03.2015	3,14	4,44	3,40	4,38
30.03.2015	3,30	4,41	3,53	4,24
31.03.2015	3,44	4,08	3,52	4,05
01.04.2015	3,22	4,06	3,48	3,97
02.04.2015	3,49	4,53	4,09	4,37
07.04.2015	3,42	3,94	3,62	3,37
08.04.2015	3,52	4,07	3,92	3,67
09.04.2015	3,60	4,87	4,58	4,07
10.04.2015	4,40	4,90	4,40	3,73
11.04.2015	3,79	4,68	3,79	3,89
13.04.2015	3,86	4,05	3,86	3,70
14.04.2015	4,07	4,25	4,07	3,60
15.04.2015	3,42	5,27	3,80	3,90
16.04.2015	3,52	6,13	3,95	3,81
17.04.2015	3,64	8,84	4,16	3,87
18.04.2015	3,29	9,40	3,54	3,26
19.04.2015	3,56	11,50	3,83	3,46
20.04.2015	-	-	3,92	3,61
21.04.2015	-	-	3,72	3,32
22.04.2015	-	-	4,12	3,52
23.04.2015	-	-	4,46	3,71
24.04.2015	-	-	4,19	3,85
25.04.2015	-	-	3,88	3,31
27.04.2015	-	-	3,90	3,88

Die Daten wurden durch die Firma Bioreact/Bonalytic (Troisdorf, DEU) erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Es wurde täglich Speiseöl zur Induktion der Säureanreicherung zugefüttert. k. A.: Wert wurde nicht bestimmt.

Tabelle A 18: FOS/TAC-Quotient der Proben während des zweiten Versauerungsversuches.

	Kontrolle I	Versauerung	Kontrolle II	Erholung
17.03.2015	0,19	0,29	0,20	0,25
18.03.2015	0,21	0,29	0,20	0,26
19.03.2015	0,18	0,27	0,19	0,25
20.03.2015	0,18	0,26	0,19	0,25
21.03.2015	k. A.	0,29	k. A.	0,27
23.03.2015	0,21	0,31	0,22	0,30
24.03.2015	0,19	0,29	0,20	0,28
25.03.2015	0,19	0,29	0,20	0,27
26.03.2015	0,18	0,29	0,20	0,28
27.03.2015	0,20	0,29	0,22	0,27
28.03.2015	0,18	0,29	0,19	0,29
30.03.2015	0,19	0,29	0,20	0,29
31.03.2015	0,21	0,29	0,21	0,29
01.04.2015	0,18	0,26	0,19	0,26
02.04.2015	0,20	0,30	0,24	0,30
07.04.2015	0,20	0,26	0,21	0,26
08.04.2015	0,20	0,27	0,22	0,28
09.04.2015	0,21	0,33	0,26	0,31
10.04.2015	0,26	0,35	0,26	0,31
11.04.2015	0,22	0,33	0,22	0,30
13.04.2015	0,23	0,28	0,23	0,31
14.04.2015	0,24	0,30	0,24	0,33
15.04.2015	0,21	0,39	0,22	0,33
16.04.2015	0,22	0,52	0,24	0,34
17.04.2015	0,22	0,80	0,25	0,35
18.04.2015	0,19	0,95	0,21	0,29
19.04.2015	0,20	1,04	0,23	0,31
20.04.2015	-	-	0,23	0,30
21.04.2015	-	-	0,23	0,27
22.04.2015	-	-	0,25	0,29
23.04.2015	-	-	0,26	0,28
24.04.2015	-	-	0,26	0,29
25.04.2015	-	-	0,24	0,24
27.04.2015	-	-	0,23	0,28

Die Daten wurden durch die Firma Bioreact/Bonalytic (Troisdorf, DEU) erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Es wurde täglich Speiseöl zur Induktion der Säureanreicherung zugefüttert. k. A.: Wert wurde nicht bestimmt.

Tabelle A19: Mittels Archaea-spezifischer 16S-Aplikonsequenzierung ermittelte Relative Abundanzen [%] der einzelnen Genera (nach RDP-Klassifizierung) im Verlauf von Prozessstörungen.

Genus	Kontrolle	leichte Hemmung	schwere Hemmung	"Erholung"	Kontrolle I	Versauerung	Kontrolle II	Erholung
<i>Methanoculleus</i>	45,5	65,8	11,8	8,1	5,0	0,9	2,0	1,5
<i>Methanomassiliicoccus*</i>	25,1	14,8	13,8	9,4	2,2	0,2	0,8	0,7
<i>Methanobacterium</i>	0,8	3,4	29,7	27,8	1,0	20,4	4,0	5,9
<i>Methanobrevibacter</i>	0,4	0,8	9,2	14,6	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Methanosphaera</i>	0,2	0,0	4,6	19,2	0,0	0,0	0,1	0,0
<i>Methanimicrococcus</i>	1,5	0,1	0,4	3,1	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Methanosarcina</i>	0,4	0,9	10,8	6,2	90,5	78,4	91,5	91,7
<i>Methanothermobacter</i>	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Methanospirillum</i>	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Methanotrix</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
nicht klassifizierbar	26,0	14,1	19,8	10,1	1,2	0,1	1,5	0,3

*: Aufgrund der höheren Konfidenz erfolgte die Zuordnung mit Hilfe des RDP-Calssifier

Tabelle A20: Mittels Bacteria-spezifischer 16S-Aplikonsequenzierung ermittelte Relative Abundanzen [%] der einzelnen Phyla (nach RDP-Klassifizierung) in den verschiedenen Anlagen.

Phylum	Anlage A Januar_2015	Anlage B November_2014	Anlage C November_2014	Anlage KA	Anlage KL
<i>Firmicutes</i>	73,57	82,65	73,83	20,80	63,49
<i>Cloacimonetes</i>	12,94	1,87	10,49	15,41	23,54
<i>Proteobacteria</i>	0,50	0,35	0,39	28,19	0,55
<i>Spirochaetes</i>	2,60	1,17	0,45	1,57	1,67
<i>Bacteroidetes</i>	2,39	0,90	3,14	3,21	0,88
<i>Actinobacteria</i>	0,40	0,60	0,21	5,74	0,21
<i>Synergistetes</i>	0,33	0,50	0,28	4,85	0,41
<i>Tenericutes</i>	2,17	0,31	0,90	0,07	0,42
<i>Verrucomicrobia</i>	0,36	0,23	0,09	2,78	0,26
<i>Thermotogae</i>	0,01	0,00	0,11	2,36	0,06
<i>Aminicenantes</i>	0,01	0,00	0,00	0,15	0,00
<i>Armatimonadetes</i>	0,00	0,00	0,02	0,22	0,05
<i>Atribacteria</i>	0,28	0,50	0,19	0,42	0,42
BRC1	0,01	0,00	0,00	0,15	0,00
<i>Acidobacteria</i>	0,05	0,00	0,21	0,38	0,06
<i>Candidatus Saccharibacteria</i>	0,05	0,00	0,00	0,51	0,00
<i>Chloroflexi</i>	0,03	0,00	0,00	0,74	0,19
<i>Deinococcus- Thermus</i>	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
<i>Fibrobacteres</i>	0,15	0,00	0,00	0,51	0,00
<i>Fusobacteria</i>	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00
<i>Hydrogenedentes</i>	0,00	0,00	0,00	0,76	0,02
<i>Ignavibacteriae</i>	0,00	0,01	0,00	0,12	0,00
<i>Latescibacteria</i>	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
<i>Lentisphaerae</i>	0,27	0,05	0,13	0,01	0,05
nicht klassifizierbar	3,88	10,82	9,56	10,98	7,72

Tabelle A21: Mittels Bacteria-spezifischer 16S-Aplikonsequenzierung ermittelte Relative Abundanzen [%] der einzelnen Familien (nach RDP-Klassifizierung) innerhalb der Ordnung der *Clostridiales* in den verschiedenen Anlagen.

Familie	Anlage A	Anlage B	Anlage C	Anlage KA	Anlage KL
<i>Clostridiaceae_1</i>	5,8	18,8	16,0	4,5	2,6
<i>Clostridiaceae_2</i>	0,1	0,2	0,1	0,0	0,2
<i>Clostridiales_Incertae_Sedis_III</i>	1,2	1,9	1,5	0,2	2,2
<i>Clostridiales_Incertae_Sedis_XI</i>	12,2	2,9	27,4	17,9	42,2
<i>Clostridiales_Incertae_Sedis_XII</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Clostridiales_Incertae_Sedis_XIII</i>	0,2	0,1	0,4	6,0	0,5
<i>Defluviitaleaceae</i>	0,4	2,5	1,4	0,0	0,3
<i>Eubacteriaceae</i>	0,1	0,3	0,0	0,0	0,0
<i>Gracilibacteraceae</i>	0,3	0,0	0,9	12,0	0,3
<i>Incertae_Sedis_XI</i>	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0
<i>Lachnospiraceae</i>	8,0	7,5	3,7	2,1	4,2
<i>Peptococcaceae_1</i>	0,1	0,0	0,1	0,0	0,2
<i>Peptococcaceae_2</i>	0,7	0,3	0,9	1,1	0,5
<i>Peptostreptococcaceae</i>	0,0	0,2	0,2	0,9	0,9
<i>Ruminococcaceae</i>	23,3	29,3	29,5	32,2	24,7
<i>Syntrophomonadaceae</i>	3,6	1,2	6,3	8,5	2,9
nicht klassifizierbar	44,0	34,6	11,7	14,6	18,1

Tabelle A22: Mittels *Bacteria*-spezifischer 16S-Applikensequenzierung ermittelte Relative Abundanzen [%] der einzelnen Phyla (nach RDP-Klassifizierung) im Verlauf von Prozessstörungen.

Phylum	Ammonium-Intoxikation I				Versauerung II			
	Kontrolle	leichte Hemmung	schwere Hemmung	"Erholung"	Kontrolle I	Versauerung	Kontrolle II	Erholung
<i>Firmicutes</i>	76,88	63,87	74,49	78,97	52,38	95,64	78,09	75,18
<i>Cloacimonetes</i>	6,82	13,45	8,91	7,30	31,24	0,26	6,67	8,83
<i>Bacteroidetes</i>	3,07	1,03	0,82	1,09	2,75	0,38	1,25	0,66
<i>Spirochaetes</i>	3,12	10,06	4,11	4,20	3,21	0,26	1,41	0,46
<i>Tenericutes</i>	2,39	4,20	3,29	1,05	4,48	0,14	9,31	11,49
<i>Synergistetes</i>	0,89	0,57	0,35	0,40	0,08	0,57	0,22	0,22
<i>Proteobacteria</i>	0,75	2,77	1,87	3,07	0,72	0,96	0,26	0,34
<i>Verrucomicrobia</i>	0,58	0,55	0,41	0,18	0,66	0,17	0,10	0,09
<i>Lentisphaerae</i>	0,50	0,12	0,08	0,02	0,06	0,00	0,15	0,02
<i>Actinobacteria</i>	0,19	0,97	1,00	0,78	0,20	0,38	0,31	0,16
<i>Fibrobacteres</i>	0,21	0,07	0,04	0,02	0,04	0,00	0,02	0,00
<i>Acidobacteria</i>	0,12	0,09	0,01	0,00	0,01	0,10	0,00	0,01
<i>Aminicenantes</i>	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Armatimonadetes</i>	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05
<i>Atribacteria</i>	0,10	0,23	0,50	0,64	0,05	0,07	0,27	0,11
BRC1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Candidatus Saccharibacteria</i>	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,10	0,05	0,15
<i>Chloroflexi</i>	0,09	0,07	0,03	0,03	0,02	0,00	0,00	0,00
<i>Deinococcus-Thermus</i>	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,02	0,01	0,01
<i>Fusobacteria</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Hydrogenedentes</i>	0,03	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Ignavibacteriae</i>	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00
<i>Latescibacteria</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Thermotogae</i>	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
nicht klassifizierbar	4,17	1,90	4,06	2,21	4,09	0,91	1,87	2,21

Tabelle A23: Mittels Bacteria-spezifischer 16S-Aplikonsequenzierung ermittelte Relative Abundanzen [%] der einzelnen Familien (nach RDP-Klassifizierung) innerhalb der Ordnung der *Clostridiales* im Verlauf von Prozessstörungen.

Familie	Ammonium-Intoxikation I				Versauerung II			
	Kontrolle	leichte Hemmung	schwere Hemmung	"Erholung"	Kontrolle I	Versauerung	Kontrolle II	Erholung
<i>Clostridiaceae_1</i>	3,4	1,9	0,6	3,8	12,4	0,1	4,7	3,0
<i>Clostridiaceae_2</i>	0,8	0,7	1,1	0,4	0,1	0,0	0,0	0,0
<i>Clostridiales_Incertae_Sedis_III</i>	1,0	0,5	0,9	1,7	0,3	1,2	0,3	0,1
<i>Clostridiales_Incertae_Sedis_XI</i>	4,6	2,2	13,8	6,0	7,9	10,1	8,0	8,5
<i>Clostridiales_Incertae_Sedis_XII</i>	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Clostridiales_Incertae_Sedis_XIII</i>	0,0	0,1	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1
<i>Defluviitaleaceae</i>	0,1	0,0	0,0	0,0	1,6	0,0	0,6	1,1
<i>Eubacteriaceae</i>	0,0	0,0	0,3	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Gracilbacteraceae</i>	2,2	2,7	1,1	0,0	0,2	0,0	0,1	0,1
<i>Incertae_Sedis_XI</i>	0,0	0,6	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0
<i>Lachnospiraceae</i>	6,2	13,8	4,5	5,1	6,7	1,4	5,1	2,9
<i>Peptococcaceae_1</i>	0,2	0,5	0,2	0,0	0,2	0,0	0,1	0,2
<i>Peptococcaceae_2</i>	0,1	0,1	0,0	0,1	0,7	0,1	0,1	0,1
<i>Peptostreptococcaceae</i>	0,3	0,1	0,1	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Ruminococcaceae</i>	31,3	21,5	44,4	10,1	49,8	25,9	58,4	11,8
<i>Syntrophomonadaceae</i>	1,6	2,1	1,0	0,9	2,8	4,2	2,0	12,9
nicht klassifizierbar	48,3	53,1	31,6	70,9	17,1	56,7	20,4	59,1

DANKSAGUNG

Meinen herzlichen Dank möchte ich an Herrn Prof. Rother richten, der mich als Betreuer dieser Arbeit immer unterstützt hat und mir stets beratend zur Seite stand.

Auch Frau Prof. Röske möchte ich für ihre Unterstützung und viele aufmunternde Worte danken.

Ein besonderer Dank geht natürlich an Kerstin, auf deren Rat und fachliche Unterstützung ich mich während der gesamten Promotionszeit immer verlassen konnte. Vielen Dank, dass Du durch viele weiterführende Diskussionen und hilfreiche Ratschläge so maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hast!

Außerdem möchte ich mich bei allen BioPara-Projektpartnern bedanken, die zum guten Gelingen des Projektes beigetragen haben. Besonders möchte ich dabei die Firma Bioreact/Bonalytic hervorheben, die alle Probenahmen und Hemmversuche organisiert und durchgeführt hat. Vielen Dank auch an Tobias für das Abfüllen der Proben, das zur Verfügung stellen Deiner Isolate und viele hilfreiche Gespräche.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei der DREWAG und der Stadtentwässerung Dresden, die mir die Proben aus den Anlagen in Kaditz und Klotzsche zur Verfügung stellten.

Ein riesengroßes Dankeschön will ich auch Carola, Anne und Janine aussprechen. Ohne Eure gute Laune und Freundschaft im Labor, viele lustige, ernste, aufmunternde und auch fachliche Gespräche wäre dieses Werk sicher nicht entstanden. Mädels, Ihr seid klasse! An dieser Stelle sei auch gesagt: Carola, Du bist die welt tollste Zählfee der Welt, die je stundenlang in der Gruft zugebracht hat ;). Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Olena für ihre Unterstützung im Labor.

Nicht zuletzt möchte ich natürlich auch meiner Familie, ganz besonders meinen Eltern, danken. Ihr habt immer hinter mir gestanden, mir (wann immer nötig) geholfen und mich in jeder Krise wieder aufgemuntert. Ohne Euch gäbe es diese Arbeit nicht. Vielen Dank, dass Ihr immer für mich da seid!